

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Ekstratsellulaarsete peptiidide mõju *Pseudomonas putida* biofilmile

***fis*-i üleekspressiooni tingimustes**

Magistritöö

30 EAP

Marge Puhm

Juhendaja PhD Riho Teras

TARTU 2020

Ekstratsellulaarsete peptiidide mõju *Pseudomonas putida* biofilmile

***fis*-i üleekspressiooni tingimustes**

Pseudomonas putida on taimede kasvu soodustav bakter, mis koloniseerib taimede juuri ja moodustab biofilmi. Taimejuurtele kinnitumiseks ja biofilmi moodustamiseks toodab *P. putida* pinnavalku LapA, mille ekspressiooni mõjutab olulisel määral globaalne regulaatorvalk Fis (ingl *factor for inversion stimulation*). Fis-i üleekspressiooni biofilmi võimendav efekt ilmneb polükatioonse peptiidi olemasolul bakteri kasvukeskkonnas ning biofilmi soodustav toime käib arvatavasti adhesioonivalgu LapA kaudu.

Märksõnad: biofilm, *Pseudomonas putida*, Fis, peptiidid

CERCS kood ja nimetus: B220 – geneetika, tsütogeneetika

B230 – mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Effect of extracellular peptides on *Pseudomonas putida* biofilm by overexpression of *fis*

Pseudomonas putida is a rhizospheric bacterium that forms biofilm on plant roots and promotes plant growth. The global transcription regulator Fis (factor for inversion stimulation) increases biofilm formation in *P. putida* via regulating the expression of adhesion protein *lapA* gene. *Fis* overexpression's positive effect on biofilm occurs in the presence of polycationic peptide in the medium.

Keywords: Biofilm, *Pseudomonas putida*, Fis, peptides

CERCS code and designation: B220 – genetics, cytogenetics

B230 – microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

Infoleht	2
Sisukord	3
Sissejuhatus	5
2. Kirjanduse ülevaade	6
2.1. Kosmopoliitne bakter <i>Pseudomonas putida</i>	6
2.2. <i>P. putida</i> biofilm	7
2.3. LapA ja LapF.....	8
2.4. Biofilmi regulatsioon	10
2.5. Adhesioon.....	11
3. Eksperimentaalosa	13
3.1. Töö eesmärk.....	13
3.2. Materjal ja meetodika	13
3.2.1. Bakteritüved ja söötmed	13
3.2.2. Biofilmi biomassi mõõtmine.....	15
3.2.3. <i>P. putida</i> tüvede kasvukõvera karakteristikute määramine	15
3.2.4. Statistiline analüüs	16
3.4. Tulemused	17
3.4.1. <i>P. putida</i> kasvukiirus.....	17
3.4.2. <i>P. putida</i> biomass LB-s ja M9 söötmetes.....	19
3.4.3. <i>P. putida</i> biofilmi dünaamika LB-s ja M9 söötmetes.....	20
3.4.3.1. <i>P. putida</i> biofilmi dünaamika LB-täissöötmes	21
3.4.3.2. <i>P. putida</i> biofilmi dünaamika M9 söötmes.....	23
3.4.3.3. <i>P. putida</i> biofilmi dünaamika M9 1,4% CAA söötmes	24
3.4.3.4. <i>P. putida</i> biofilmi dünaamika M9 trüptoniga söötmes	26
3.4.4. Polüpeptiidide mõju <i>P. putida</i> 24 h biofilmile.....	28
3.4.5. Polü-L-lüsiini mõju <i>P. putida lapA</i> ja <i>lapF</i> mutantsete tüvede 24 h biofilmile	30

3.6. Arutelu.....	32
Kokkuvõte.....	37
Summary.....	38
Tänu sõnad	39
Kasutatud kirjandus.....	40

Sissejuhatus

Enamikus ökosüsteemides kasvavad mikroobid pinnaga seotud ja rakuväliste biopolümeeride maatriksiga ümbritsetud paiksetes kooslustes, mida nimetatakse biofilmiks. Inimese seisukohalt lähtudes võib biofilmi tähtsuse jagada kaheks: kahjulikuks ja kasulikuks. Biofilmi negatiivse efekti parimaks näiteks on kroonilised infektsioonid, mis kujutavad endast sisuliselt biofilmi ning mille ravi on kulukas. Samas, keskkonnakaitstes on pälvinud huvi biofilmi kasutamine biolagundamisel ja saasteainete kõrvaldamisel. Biofilmi kasutamine põllumajanduses, eeskätt taimekasvatustes, võimaldab soodustada taimede kasvu ja tõsta saagikust.

Teadagi on mitmeid geneetilisi tegureid, mis on tähtsad biofilmi moodustamisel erinevates bakteriliikides ning kirjeldatud on ka seda protsessi mõjutavaid keskkonna- ja rakusignaale.

Meie laboris on bakteriaalse biofilmi mudelorganismiks *Pseudomonas putida*. Eelnevate töödega on näidatud, et globaalne regulaatorvalk Fis soodustab *P. putida* biofilmi moodustumist ning selleks on vajalik pinnavalk LapA. Fis-i üleekspressioon suurendab adhesioonivalgu LapA hulka rakus, aktiveerides *lapA* transkriptsiooni.

Fis-i üleekspressioon soodustab *P. putida* biofilmi biomassi suurenemist eelkõige küpses faasis ning see sõltub söötimest, milles bakter kasvab. Varasema töö tulemus viitas sellele, et oluline on valgulise komponendi, tõenäoliselt peptiidide, sisaldus söötmes. Seetõttu sai selle töö eesmärgiks selgitada, kas Fis-i positiivne mõju *P. putida* biofilmile sõltub ekstratsellulaarsetest peptiidest ning kas see efekt on üldine ehk peptiidide primaarjärjestusest sõltumatu.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1. Kosmopoliitne bakter *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida on laialt levinud gramnegatiivne bakter, mis suudab ellu jääda ja jõudsalt areneda tänu oma tähelepanuväärsele ja mitmekülgsele ainevahetusele. Kompleksse ainevahetuse abil suudab bakter elada karmides keskkonnatingimustes ja vastu pidada füüsikalise-keemilisele stressile (Timmis 2002, Wackett 2003). *P. putida* tüvi KT2440 on väga hästi iseloomustatud mudelorganism, mida kasutatakse biolagundamise uuringutes (Santos jt. 2004). *P. putida* tüved võivad lagundada mitmesuguseid kemikaale, jäädes samas märkimisväärselt tundetuks orgaaniliste lahustite ja muude keskkonnamõjude suhtes. Need omadused muudavad *P. putida* kõrgelt hinnatud biokatalüsaatoriks (Kohlstedt jt. 2018). *P. putida*’l puuduvad virulentsusfaktorid (Nelson K. E. jt. 2002, Belda jt. 2016, Udaondo jt. 2016) ning lisaks on *P. putida* geneetiliselt muundatav ja seetõttu sobivaks tööriistaks nii mikrobioloogia alusuuringute kui ka rakendusuuringu jaoks (Nikel ja de Lorenzo 2018).

P. putida sobib bakteriaalse biokontrolli vahendiks, kuna suudab tõhusalt koloniseerida taimede seemneid (Espinosa-Urgel jt. 2000) ja risosfääri (Molina jt. 2000). Idanemisel erituvad keskkonda mitmesugused aminohapped, suhkrud ja orgaanilised happed ning juureeritistes sisalduvad toitained pakuvad bakterile rahuldavat elupaika (Bais jt. 2006, Chaparro jt. 2014). Koloniseerides taime juuri käitub *P. putida* kui taimepatogeenide otsene niši- ja ressursikonkurent (Bolwerk jt. 2003, Bernal jt. 2017, Kwak jt. 2018), mis suudab taimedes aktiveerida indutseeritud süsteemse resistentsuse (Matilla jt. 2010). Samas *P. putida* soodustab taimede kasvu tänu fosfaadi ja raua hankimisele (Santos jt. 2004, Matilla jt. 2011a). Kõik need omadused muudavad *P. putida* agrobiotehnoloogia huviobjektiks, kuna sel bakteril on suur bioloogilise tõrjevahendi potentsiaal (Oliver jt. 2019).

2.2. *P. putida* biofilm

Mikroorganismide biofilmi moodustamine võimaldab stabiilset kolonisatsiooni elutul ja elaval pinnal. Biofilmi moodustumine toimub järjestikuste etappidena: kinnitumine, mikrokolooniate moodustumine, küpsemine ja lagunemine. Pinnale kinnitunud bakterid moodustavad mikrokolooniaid ja toodavad biofilmi maatriksit, mis tavaliselt koosneb veest, eksopolüsahhariididest, valkudest ja rakuvälisest DNA-st. Mikrokolooniad arenevad küpseks biofilmiks (Monds ja O'Toole 2009), mis tagab stabiilse keskkonna ja pakub kaitset ebasoodsate tingimuste eest (Davey ja O'Toole 2000, Mortel jt. 2004). Küps biofilm on dünaamiline struktuur, milles biofilmi kõigi elutsükli etappidele iseloomulikud rakud võivad esineda üheaegselt (Sauer jt. 2002). Küps biofilm on heterogeenne nii metaboolsest kui ka rakkude jagunemise seisukohast, mis tagab biofilmi populatsioonile suurema vastupidavuse ja kohanemisvõime (Kaplan 2010).

P. putida's on kindlaks tehtud mitu biofilmi arengu jaoks olulist tegurit (Klausen jt. 2006). On tõestatud, et vibur aitab kaasa esialgsele pinnale kinnitumisele ja üleminekul mikrokolooniatelt küpsele biofilmile (Klausen jt. 2006). Viburi abil liikumine on bakterile oluline nii sümbioosi loomiseks taimega kui ka otseselt liikumiseks eelistatud keskkonnaniši poole (Österberg jt. 2010). Biofilm tähendab paikset eluviisi, mil bakterirakud kinnituvad lisaks pinnale ka üksteise külge ja viburiga liikumine ei ole vajalik kuni biofilmi lagunemiseni ning rakkude tagasipöördumiseni planktilise eluvormi juurde (Monds ja O'Toole 2009). Liigse energiakulu vältimiseks on biofilmis bakterirakkude viburi pöörlemine inhibeeritud (Martínez-García jt. 2014). *P. putida* viburi geenide ekspressioon pärsitakse kiiresti pinnale kinnitumise järel, kuid biofilmi arengu hilisematel etappidel reguleeritakse uuesti üles (Sauer ja Camper 2001). *P. putida* rakkude kontaktiks pinnaga ja esialgseks kinnitumiseks on oluline viburi olemasolu (Yousef-Coronado jt. 2008), aga seondumiseks nii biotiliste kui ka abiotiliste materjalidega on vajalik kleepvalk LapA (Espinosa-Urgel jt. 2000, Duque jt. 2013). Kinnitumisele järgneb bakterite kasv ning paljunemine pinnal, mille tulemusena moodustavad mikrokolooniad. *P. putida* rakkude substraadile kinnitumisele järgneb umbes 6–7 rakujagunemist ja rakkude kiire tasapinnaline levik enne kui kolooniad muutuvad kolmemõõtmelisteks (Acemel jt. 2018). Selles etapis algab biofilmi maatriksi süntees. Rakuvälise maatriksi koostis on keeruline ja varieeruv erinevate bakteriliikide vahel ja isegi sama liigi sees erinevates keskkonnatingimustes.

P. putida moodustatud biofilmi maatriksi sisaldab rakuvälist DNA-d (Steinberger ja Holden 2005) ja eksopolüsahhariidide segu. *P. putida* biofilmis näib rakuvälisel DNA-l olevat aga sekundaarne roll, kuna DNA-sil on vähene mõju biofilmile, proteaasiga töötlemine põhjustab aga biofilmi lagunemist (Yousef-Coronado jt. 2011, Moor jt. 2014).

P. putida tüved võivad toota tselluloosi (*bcs*-geenid), alginaati (*alg*-geenid), *P. putida* eksopolüsahhariidi a (Pea, *pea*-geenid) ja *P. putida* eksopolüsahhariidi b (Peb, *peb*-geenid), mis osalevad biofilmi maatriksi moodustumises ja panustavad biofilmi stabiilsusesse (Chang jt. 2007, Nilsson jt. 2011). Tselluloos ja alginaat võivad vähendada oksüdatiivset stressi, mille on põhjustanud füüsikalised või keemilised keskkonnategurid (Svenningsen jt. 2018). Alginaadi biosünteesi *algD*-operoni ekspresseeritakse konkreetsetes füsioloogilistes tingimustes. *P. putida*'s on see operon ülesreguleeritud veenappuse tingimustes (Chang jt. 2007), *P. aeruginosa* puhul sõltub aga rauasisaldusest (Wiens jt. 2014).

Siiski, *P. putida* biofilmi maatriksi kõige olulisem komponent on pinnavalk LapA (Gjermansen et jt. 2010, Moor jt. 2014), kuna *lapA*-mutantide võime moodustada biofilmi on tugevalt vähenenud. Samas, kui eksopolüsahhariide kodeerivate geenide (*bcs*, *alg*, *pea* ja *peb*) inaktiveerimisel on *P. putida* endiselt võimeline biofilmi moodustama suhteliselt hästi (Nilsson jt. 2011). *P. putida*'s leidub ka teine suur kleepvalk LapF, mis koos LapA-ga arvatakse osalevat küpse biofilmi tekkes (Espinosa-Urgel jt. 2000, Martínez-Gil jt. 2010, Yousef-Coronado jt. 2011).

2.3. LapA ja LapF

Gramnegatiivsed bakterid toodavad RTX (ingl *repeats-in-toxin*) valke, mille tunnuseks on üheksa aminohappe kordused konsensusjärjestusega GGxG(N/D)Dxxx. (Satchell 2011) RTX valkude perekonda kuulub ka LapA (ingl *large adhesion protein A*), mida on vaja *P. putida* ja *Pseudomonas fluorescens* biofilmi moodustumiseks (Espinosa-Urgel jt. 2000, Hinsä jt. 2003), kuid mis puudub patogeensetes pseudomoonastes nagu *P. aeruginosa* ja *P. syringae* (Hinsä jt. 2003, Duque jt. 2013).

P. putida valk LapA koosneb neljast domeenist. Esmalt bakterist väljuv C-terminaalne domeen 13 RTX kordusega (Hinsä jt. 2003) ja signaaljärjestusega, mis juhib valku läbi 1. tüüpi

sekretsioonisüsteemi (T1SS). Adhesiin väljub läbi T1SS-i voltumata kujul, kuid jääb välismembraani kinni eelvolditud N-terminaalse domeeni abil. N-terminaalse kinnitusmooduli ja C-terminaalse sekretsioonisignaali vahele jäävad erinevad kordusjärjestused ning ligandi siduv piirkond koos von Willebrandi faktori tüüp A (vWA) domeeniga. Ligandi siduvate domeenide sihtspetsiifilisus aitab bakterit suunata selle optimaalsesse keskkonnanišši ning määrab substraadid ja partnerid, millega bakterid biofilmi moodustamisel seonduvad. Suurema osa valgu molekulmassist moodustavad kordusjärjestused, mille ülesanne on suurendada ligandi siduvate domeenide siruulatust bakteripinnalt, eemale bakteri rakumembraanist ja selle potentsiaalselt segavatest pinnakomponentidest. (Guo jt. 2019)

Ehkki paljudel *P. putida* ja *P. fluorescens* tüvedel on LapA geen, siis korduste arvu varieerumine põhjustab valgu suuruse erinevust nii liigiti kui ka tüvede vahel. *P. putida* lapA kodeerib 8682 aminohappest koosnevat valku (Santos jt. 2004), aga *P. fluorescens* Pf0-1 LapA sisaldab 5218 aminohapet (Boyd jt. 2014). LapA on peamine kleepvalk, mida *P. fluorescens* ja *P. putida* kasutavad biofilmi moodustamiseks erinevatel pindadel. LapA vahendatud adhesioonil hüdrofiilsele pinnale osaleb tõenäoliselt C-terminaalne domeen ja kinnitumist hüdrofoobsele substraadile soodustab kordusjärjestuste piirkond. (El-Kirat-Chatel jt. 2014, Boyd jt. 2014)

P. putida küpse biofilmi moodustamiseks on vaja ka suuruselt teist, 6310 aminohappest koosnevat pinnavalku LapF, mis on sellele bakterile ainuomane (Espinosa-Urgel jt. 2000, Fuqua 2010, Martínez-Gil jt. 2012). LapF koosneb N-terminaalsest domeenist, millele järgneb 64 kordust. Kolmandasse, C-terminaalsesse domeeni kuulub kaks RTX motiivi (Martínez-Gil jt. 2010).

Kuigi LapA on oluline ka biofilmi küpsemise hilisemas järgus (Gjermansen jt. 2010, Moor jt. 2014), on see kleepvalk hädavajalik biofilmi moodustumise algetapis pöördumatuks kinnitumiseks pinnale (Espinosa-Urgel jt. 2000, Hinsä jt. 2003). Arvatakse, et LapF-i on vaja hiljem rakkude omavaheliseks seondumiseks, mis võimaldab mikrokolooniate teket (Martínez-Gil jt. 2010, Martínez-Gil jt. 2012). Kuna *P. putida* biofilmi erinevates arenguetappides on vaja kahte suurt valku, siis arvatavasti on need määrava tähtsusega mitmerakulise ja keeruka struktuuriga biofilmi tekkes (Fuqua 2010, Martínez-Gil jt. 2010). LapA on hiiglaslik valk, mille ülesanne on aidata selle bakteril seonduda substraadiga konkreetsetes nišis ja moodustada biofilmi. Rakkude vahelise tihedama kontakti loomiseks kasutatakse tõenäoliselt väiksemat adhesioonivalku LapF, mis ei pruugi olla vajalik (või kasulik) teiste substraatidega seondumiseks.

2.4. Biofilmi regulatsioon

Biofilmi moodustumine toimub adhesiooni, proliferatsiooni ning mikrokolooniate moodustumise ja küpsemise etappidena ning biofilmi programmeeritud lagunemisega (O'Toole jt. 2000, Monds ja O'Toole 2009). Etapiviisiline biofilmi moodustumine eeldab faktorite õigeaegset ekspressiooni vastusena keskkonnasignaalidele ning hõlmab mitmesuguseid signaaliülekanne- ja regulatoorseid radu, et tagada ammendav füsioloogiline vastus (Monds ja O'Toole 2009). Tsükliline-di-GMP (c-di-GMP) on biofilmi arengus keskse tähtsusega rakusisene sekundaarne signaalmolekul, mis koordineerib bakteri liikumist, virulentsust ja biofilmi kujunemist (Römling jt. 2013, Jenal jt. 2017). Üldiselt seostatakse rakusisese c-di-GMP kõrget kontsentratsiooni biofilmi tootmisega ja vähene c-di-GMP sisaldus seostub suurenenud liikuvuse ja virulentsusega.

Transkriptsiooni regulaator FleQ reguleerib *P. putida* biofilmi ja viburigeenide ekspressiooni ning aitab kontrollida üleminekut planktiliselt eluvormilt biofilmiks (Xiao *et al.* 2016, Jiménez-Fernández *et al.* 2016, Blanco-Romero *et al.* 2018). C-di-GMP-ga seondunud FleQ represseerib *bcs*-operoni transkriptsiooni, kuid aktiveerib *lapA* transkriptsiooni (Xiao jt. 2016b, Blanco-Romero jt. 2018).

Biofilmi moodustumiseks on oluline LapA olemasolu raku pinnal. LapA viiakse tsütoplastmast raku pinnale läbi ABC-transportersüsteemi, mille moodustavad valgud LapB, LapC ja LapE (Hinsa jt. 2003). LapB on sise- ja LapE välismembraanivalk, mida adhesiini transportimise ajal ühendab periplasmas LapC. LapA sekreteeritakse C-terminusest N-terminuse suunas, kuid LapA sekretsioon läbi LapE seiskub translokatsiooni ajal, nii et LapA N-terminaalne ots jääb periplasmasse (Smith jt. 2018). Periplasmas paikneb LapG, LapA-spetsiifiline proteaas, mille aktiivsus sõltub sisemise membraani valgust LapD (Gjermansen jt. 2005, Navarro jt. 2011). C-di-GMP-ga seotud LapD seob omakorda LapG-d, takistades LapA proteolüüsi (Gjermansen jt. 2010, Newell jt. 2011, Cooley jt. 2016).

Toitainete puudus kutsub rakkudes esile c-di-GMP hüdrolyüüsi, mille tulemusel LapG-LapD kompleks laguneb ning vabanenud LapG lõikab LapA N-terminuse, mille tulemusena biofilm laguneb (Klausen jt. 2006, Gjermansen jt. 2010). See mehhanism võimaldab ebasoodsate kasvutingimuste korral bakteril biofilmist vabaneda ja muutuda planktiliseks, et otsida

toitainerikkamat keskkonda (Navarro jt. 2011, Newell jt. 2011). Sarnane protsess on tuvastatud laboritingimustes, kus rikkas täissöötmes kasvades *P. putida* biofilmi biomass suureneb kiiresti umbes 6–10 tundi pärast pinnale kinnitumist ja seejärel biomass väheneb (Yousef-Coronado jt. 2008, Gjermansen jt. 2010, Yousef-Coronado jt. 2011, Moor jt. 2014, Costa-Gutierrez jt. 2020).

Biofilmi moodustumist reguleerib veel globaalne regulaatorvalk Fis (ingl *factor for Inversion stimulation*). *P. putida* fis-i ekspressioon on kõrgeim kiiresti kasvavates rakkudes ning väheneb statsionaarsesse faasi jõudvates rakkudes (Yuste jt. 2006). *P. putida* fis-i üleekspressioon vähendab bakteri liikuvust ning soodustab biofilmi moodustumist (Jakovleva jt. 2012). Fis-i üleekspressioon LB-s võimendab *lapA* transkriptsiooni ja seeläbi suurendab LapA hulka 1,6 korda ning samal ajal vähendab LapF-i hulka umbes 4 korda (Moor jt. 2014, Ainelu jt. 2017). Sarnaselt LB-le on *lapA* transkriptsioon võimendatud ka M9 CAA glc ja M9 CAA glc trüptooni söötmes (Puhm 2018). Samas, Fis-i biofilmi soodustav efekt puudub defineeritud M9 glc CAA söötmes ja ilmneb LB täissöötmes (Moor *et al.* 2014, Ainelu *et al.* 2017, Puhm 2018). Fis-i biofilmi võimendav efekt kaob, kui LB-d eelnevalt töödelda proteaas K-ga (Moor 2013) ning M9 söötmesse trüptooni lisamine taastab Fis-i efekti sarnaselt LB-le (Puhm 2018). Seega fis-i üleekspressioon *P. putida* rakkudes soodustab biofilmi moodustumist, kui bakteri kasvukeskkonnas leidub ekstratsellulaarset valku või peptiidi.

2.5. Adhesioon

Bakterite kinnitumisel on olulised pinna ja bakteri füüsikalised-keemilised vastasmõjud. Need hõlmavad raku pinna hüdrofoobsust ja laengut, samuti materjali pinna hüdrofoobsust, laengut, karedust ja keemilist koostist. (Loosdrecht jt. 2004, Osiro jt. 2004). Abiootilisele pinnale võib moodustuda sinna vedelsöötimest adsorbeerunud valkude ja süsivesikute kiht, mis omakorda mõjutab pinnalaengut ning hüdrofiilsust/hüdrofoobsust ja hilisemat bakterite adhesiooni (Chen jt. 2010, Lorite jt. 2011). Näiteks sülje glükoproteiinidest moodustub puhtale hambaemailile kiht, millele kinnituvad esmased koloniseerijad, nagu *Streptococcus mitis* ja bakterid perekonnast *Actinomyces* (Larsen ja Fiehn 2017). Hüdrofoobsetel interaktsioonidel on oluline roll

adhesiooniprotsessis, kuna kahe hüdrofoobse üksuse vahel saab tekkida tihedam kontakt (Azeredo ja Oliveira 2000, Oliveira jt. 2001). Oma rakuümbriste negatiivse laengu tõttu satuvad bakterid pindadele lähenedes elektrostaatiliste jõudude mõjuvälja. Viburiga liikumine toob rakud pinnale lähemale ning lihtsustab kinnitumist takistava energiabarjääri ületamist.

P. putida rakk on negatiivselt laetud ja mõõdukalt hüdrofoobne (Jucker jt. 1996, Montag jt. 2012). *P. putida* on pikliku kujuga ning kannab vibureid raku ühel poolusel, mistõttu võib bakter pinnale kinnituda pikema küljega, mis tähendab tugevat seondumist suure hulga kontaktide abil (Wang jt. 2011).

Pinnale lähemal kasutatakse kinnitumiseks muud tüüpi bakteriaalseid jätkeid, näiteks *E. coli* ja *Pseudomonas aeruginosa* piilid. (Carniello jt. 2018) Kuid ka bakterite polüsahhariidid ja pinnavalkude ahelad võivad siduda bakterirakku pinnaga. Pinnavalkude roll rakkudevahelises adhesioonis väärib tähelepanu. Teades, millise substraadiga adhesioonivalgu vastav domeen eelistatult või spetsiifiliselt seondub, on vajadusel võimalik adhesiooni ära hoida, kasutades selleks substraadiga konkureerivat analoogi. Näiteks uropatogeenne *E. coli* (UPEC) kasutab adhesiooniks piilisid, mille tipuvalk FimH tunneb ära mannoosijäägid glükoproteiinidel. Hiirtele suukaudselt manustatud mittemetaboliseeritav mannoosimimeetikum takistas bakteri adhesiini domeenil uroteelirakkudega seonduda, hoides ära kuseteede ägeda infektsiooni (Totsika jt. 2013, Spaulding jt. 2018).

Seevastu, bakterite kasutamisel bioväärtiste või patogeenide antagonistidena on vaja mõista taimede koloniseerimist vajalike bakteritega ning bakterite püsimist risosfääris. Kuna biofilm algab adhesiooniga, siis esmatähtis on uurida bakterite adhesiooni.

3. Eksperimentaalsosa

3.1. Töö eesmärk

Meie laboris uuritakse bakteriaalse biofilmi moodustumist ja seda mõjutavaid tegureid *Pseudomonas putida* näitel. *P. putida* biofilmi maatriksi olulisemad komponendid on adhesioonivalgud LapA ja LapF. Eelnevate töödega on näidatud, et globaalne regulaator Fis soodustab biofilmi moodustumist, suurendades LapA hulka (Moor jt. 2014). Fis-i biofilmi soodustav efekt ilmneb LB täissöötmes ja kaob, kui söötmes pole või on eemaldatud valguline komponent (Moor 2013). Fis-i üleekspressiooni biofilmi võimendav toime puudub defineeritud M9 glc CAA söötmes, kuid söötmesse trüptooni lisamine taastab Fis-i efekti sarnaselt LB-le (Puhm 2018). See viitab Fis-i efekti sõltumisele söötmes peptiidse komponendi olemasolust, millest tulenes selle töö hüpotees, et ekstratsellulaarsed peptiidid soodustavad *P. putida* biofilmi kujunemist. Selle töö eesmärgiks oli selgitada, kas Fis-i biofilmi soodustav toime sõltub ekstratsellulaarsetest peptiididest ning kas sellel on seos adhesioonivalkudega LapA ja LapF.

3.2. Materjal ja metoodika

3.2.1. Bakteritüved ja söötmed.

Baktoreid kasvatati LB (ingl *lysogeny broth*) täissöötmes (Bertani 1951), mis sisaldas NaCl (10 g/l), pärmiekstrakti (5 g/l) ja trüptooni (10 g/l) ning defineeritud M9 glc CAA söötmes (M9), mis sisaldas M9 puhvrit (42 mM KH_2PO_4 , 24 mM Na_2HPO_4 , 19 mM NH_4Cl , 9 mM NaCl), mikroelementide lahust (lõppkontsentratsioonidega 667,5 μM MgO, 50 μM CaCO_3 , 40 μM FeSO_4 , 12,5 μM ZnSO_4 , 12,5 μM MnSO_4 , 2,5 μM CuSO_4 , 2,5 μM CoSO_4 , 1,9 μM H_3BO_4), glükoosi (lõppkontsentratsiooniga 0,2%) ja 0,4% kaseiini hüdrolüsaati (CAA koos lisatud L-trüptofaaniga 20 $\mu\text{g/ml}$) või täiendavalt lisatud CAA-d lõppkontsentratsiooniga 1,4% (M9 1,4% CAA; tabel 1).

Tabel 1. Töös kasutatud defineeritud M9 glc CAA söötme lisandid.

lisand	tootja	kontsentratsioon söötmes
trüptoon	LabM	10 g/l
täiendavalt lisatud kaseiini hüdrolüsaat + L-trüptofaan (20 µg/ml)	BD Difco™	14 g/l
spermiin (202 Da)	Serva Feinbiochemica	0,4 g/l
polü-L-lüsiin hüdrobromiid (1000-5000 Da)	Sigma-Aldrich	0,4 g/l
polü-DL-alaniin (1000-5000 Da)	Sigma-Aldrich	0,4 g/l
polü-L-glutamaat (1500-5500 Da)	Sigma-Aldrich	0,4 g/l

Defineeritud M9 glc CAA söötmes kasutati lisandina spermiini ja polüpeptiide lõppkontsentratsiooniga 0,4 g/l või trüptooni (M9 trüptoon, 10 g/l; tabel 1). Tardsööde saadi täissöötmele agari (15 g/l) lisamisel. Seleksioonimarkeriks kasutati antibiootikume gentamütsiini (Gm, 10 µg/ml) ja streptomütsiini (Sm, 200 µg/ml). *P. putida* rakke kasvatati temperatuuril 30 °C. Vedelsöötmetes kasvatamisel aereeriti kultuure loksutil (180 pööret/min). *P. putida* F15 rakkudes *fis*-i üleekspressseerimiseks lisati söötmesse IPTG-d (lõppkontsentratsiooniga 1 mM). Töös kasutatud bakteritüvesid on kirjeldatud tabelis 2.

Tabel 2. Töös kasutatud bakteritüved

<i>Pseudomonas putida</i> tüvi	iseloomustus	allikas
PSm	PaW85; <i>glmS</i> geeni järele inserteeritud mini-Tn7-ΩSm1 (Sm ^r)	(Jakovleva jt., 2012)
F15	PaW85; mini-Tn7-ΩGm-term- <i>lacI</i> ^q -P _{tac} - <i>fis</i> -T1T2 (Gm ^r)	(Jakovleva jt., 2012)
PSm ΔlapA	PSm; ΔPP0168 (Sm ^r)	(Moor jt., 2014)
PSm ΔlapF	PSm; ΔPP0806 (Sm ^r)	(Moor jt. 2014)
F15 ΔlapA	F15; ΔPP0168 (Gm ^r)	(Moor jt. 2014)
F15 ΔlapF	F15; ΔPP0806 (Gm ^r)	(Moor jt. 2014)

3.2.2. Biofilmi biomassi mõõtmine.

Biofilmi biomassi mõõtmiseks kasvatati rakke üleöö ette söötmes, milles ka uuriti biomassi moodustumist. Värske sööde mikrotiiterplaadis (Greiner Bio-One 655180) inokuleeriti üleöö kasvatatud rakkudega või vastava rakulahjendusega arvestusega 5 µl rakke ja 100 µl söödet iga kannu kohta. *Fis*-i üleekspressiooni indutseerimiseks lisati IPTG-d (lõppkontsentratsiooniga 1mM). Rakke inkubeeriti temperatuuril 30 °C ja biofilmi biomassi hulka mõõdeti 24 tunni möödudes.

Biofilmi dünaamika iseloomustamiseks tehti üleöökultuurist kümnekordsed lahjendused värskesse söötmesse, mida kasutati seejärel inokuleerimiseks. Rakke inkubeeriti 30 °C juures ja biofilmi biomassi hulka mõõdeti vastava ajapunkti möödudes. Ajapunktid tüve PSm korral olid 6, 13, 14, 15 ja 24 tundi ning tüve F15 biofilmi biomassi mõõdeti 6, 16, 17, 18, 19 ja 24 tunni järel.

Biofilmi biomassi hulga hindamiseks värviti see 1%-lise kristallvioleti vesilahusega (25 µl kannu kohta). 15 minuti järel eemaldati raku-värvisegu ning mikrotiiterplaati pesti destilleeritud veega kolm korda. Seejärel kahel korral lisati mikrotiiterplaadi kannu 180 µl 96% etanooli biofilmist värvi eraldamiseks ning 5 minuti möödudes pipeteeriti värvunud etanool teisele mikrotiiterplaadile. Värvunud etanool lahjendati destilleeritud veega (1:2) mikrotiiterplaadil 655101 (Greiner Bio-One). Saadud lahuse optiline tihedus mõõdeti lainepikkusel 540 nm spektrofotomeetriga Tecan Sunrise.

3.2.3. *P. putida* tüvede kasvukõvera karakteristikute määramine

P. putida PSm ja F15 tüvede kasvukiiruste leidmiseks kasvatati rakke üleöö 5 ml LB ja M9 defineeritud söötmetes temperatuuril 30 °C. Üleöö kasvanud kultuuri rakkudega inokuleeriti värsket söödet nii, et söötme optiline tihedus oleks arvutuslikult 0,1 (A_{580}). Lahjenduste seerial põhinevate kasvukõverate jaoks lahjendati üleöö kultuure söötmetes (A_{580}) OD 0,1-ni ja seejärel teostati kümnekordsed lahjendused. Kõiki suspensioone kasutati 96-süvendilise mikrotiiterplaadi

(Greiner Bio-One 655185) kaheksa kannu inokuleerimiseks. Vajadusel lisati söötmele IPTG-d lõppkontsentratsiooniga 1mM. Rakke kasvatati mikrotiiterplaadil 150 µl mahus temperatuuril 30 °C POLARstar Omega spektrofotomeetris, mis mõõtis optilist tihedust iga 7 minuti tagant 24 tunni jooksul. Saadud andmete põhjal koostati kasvukõver, millest arvutati MaxOD ja generatsiooniaeg Gompertzi mudeliga (Dalgaard ja Koutsoumanis 2001).

3.2.4. Statistiline analüüs

Statistiliseks analüüsiks kasutati paketti Statistica 13.5. Tulemusi analüüsiti multifaktoriaalse ANOVA-ga usaldusnivool 0,05. *P. putida* biofilmi biomassi dünaamikat analüüsiti General Linear Modeliga usaldusnivool 0,05. P-väärtused arvutati Bonferroni testiga programmis PostHoc. Joonistel on näidatud aritmeetilised keskmised koos keskmise 95% usalduspiiridega.

3.4. Tulemused

Regulaatorvalgu Fis mõju tuvastamiseks kasutati *fis*-i üleekspressiooniga tüve F15, sest tõenäoliselt on *fis*-i deleteerimine *P. putida*'le letaalne (Jakovleva jt. 2012). Tüve F15 rakkudes *fis*-i üleekspressioon nii LB-s kui ka M9 glc CAA (M9) söötmes on varem tõestatud *Western blot* analüüsiga (Moor 2013). Lisaks kontrolliti selle töö käigus *P. putida* tüve F15 *fis*-i üleekspressiooni *Western blot* meetodiga, kasutades M9 glc 1,4% CAA (M9 1,4% CAA) ja M9 glc CAA trüptooniga (M9 trüptoon) söötmetes kasvanud PSm (metsiktüvi) ja F15 rakulüsaate. *P. putida* F15 rakkudes on võimalik IPTG-ga *fis*-i üle ekspresseerida ka nimetatud söötmetes (andmeid pole toodud).

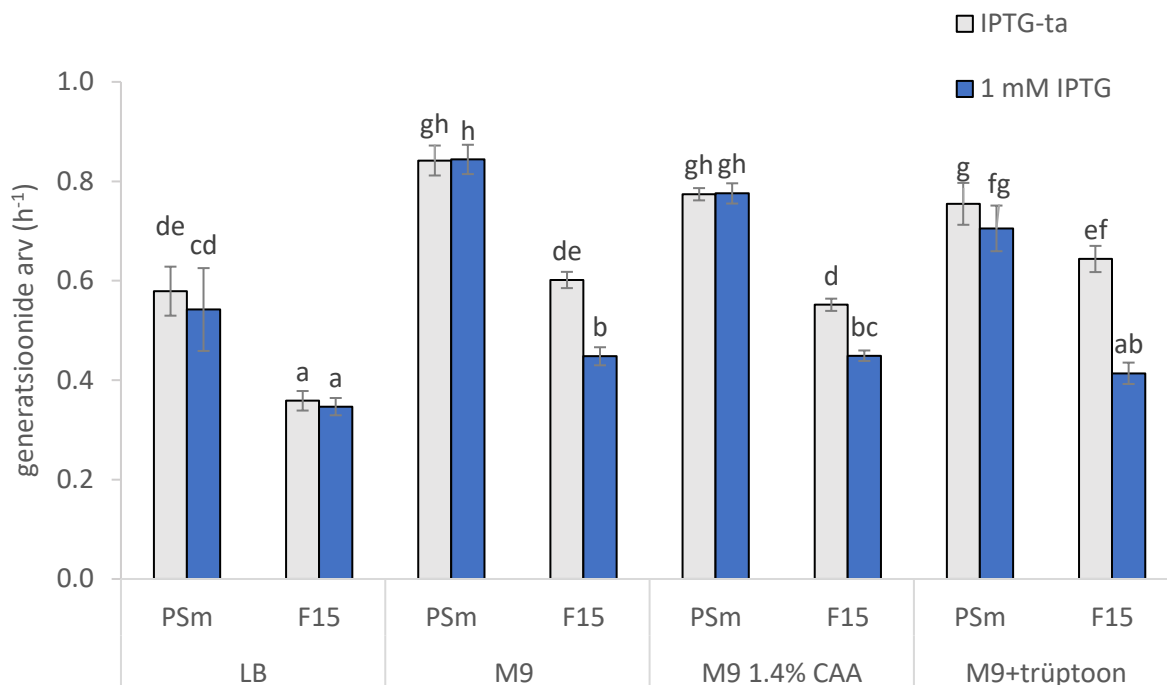
3.4.1. *P. putida* kasvukiirus

Varasemast on teada, et *P. putida* F15 kasvab LB-täissöötmes aeglasemalt kui *P. putida* PSm (Jakovleva jt. 2012). Kontrollimaks, kas see on spetsiifiline just sellele söötmele ning iseloomustamaks metsiktüve ja *fis*-i üleekspressioonitüve kasvu, mõõdeti kasvukiirusi LB, M9, M9 1,4% CAA ja M9 trüptoon söötmes. Saadud tulemustest arvutati generatsioonide arv tunni kohta, mida analüüsiti multifaktoriaalse ANOVA-ga usaldusnivool 0,05.

ANOVA-ga selgus, et *P. putida* kasvukiirusele avaldavad statistiliselt olulist mõju sööde ($F=156,61$; $df=3$; $p<0,001$), tüvi ($F=982,64$; $df=1$; $p<0,001$) ja IPTG ($F=82,4$; $df=1$; $p<0,001$; joonis 1). Seega, tüvede kasv on erinev ja sõltub keskkonnast.

Bonferroni järeltestist selgus, et faktortunnus „IPTG“ ei avalda *P. putida* metsiktüve PSm-i kasvukiirusele statistiliselt olulist mõju ($p=1$; joonis 1). IPTG iseseisva mõju puudumine metsiktüve kasvukiirusele on vastavuses varem mõõdetud andmetega (Jakovleva jt. 2012).

Tüve F15 kasvukiirus on LB-s metsiktüvest 1,6 korda aeglasem ($p<0,001$) ja faktortunnuse „IPTG“ mõju puudub ($p=1$; joonis 1). Samas, kui võrrelda IPTG mõju F15 kasvukiirustele teistes söötmetes, siis IPTG aeglustab F15 kasvukiirust (joonis 1). Kui võrrelda F15 kasvukiirusi, mis on saadud IPTG-ta söötimest söötmega, kuhu lisati IPTG-d, siis IPTG lisamine aeglustas F15 kasvukiirust M9-s 1,3 korda ($p<0,001$), M9 1,4% CAA-s 1,2 korda ($p=0,023$) ja M9+trüptoon 1,6 korda ($p<0,001$; joonis 1).



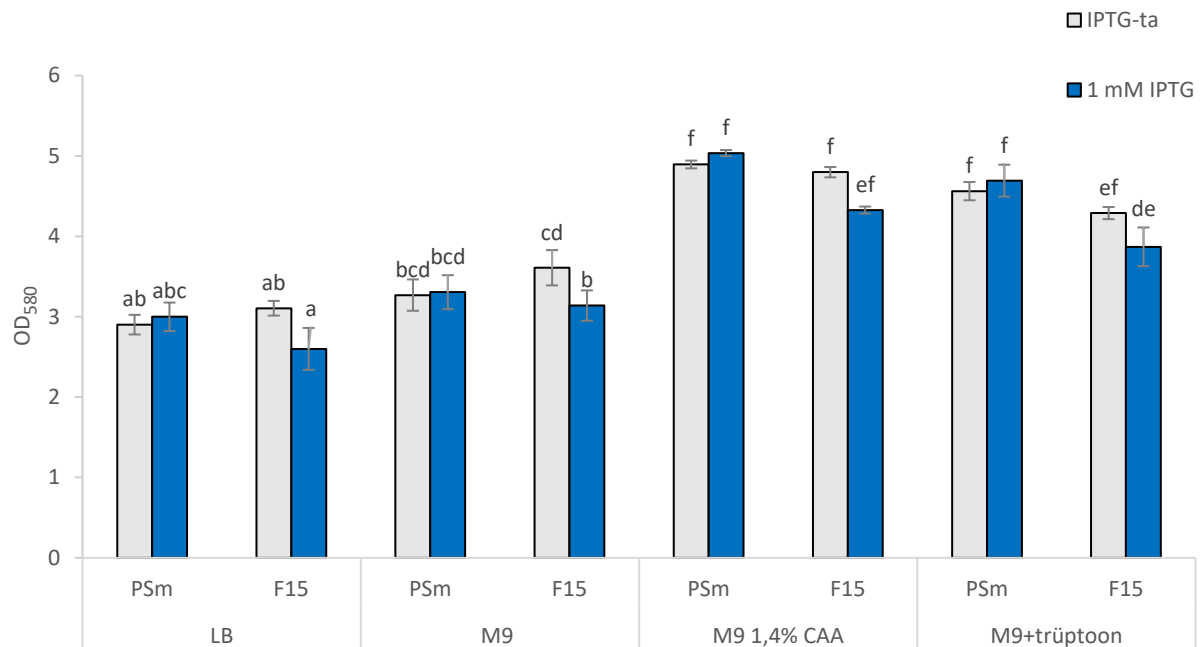
Joonis 1. *P. putida* tüvede PSm ja F15 kasvukiirus (generatsioonide arv tunnis) söötmetes LB, M9, M9 1,4% CAA, M9 trüptoon. *Fis*-i üleekspressiooni indutseerimiseks lisati IPTG-d (lõppkontsentratsiooniga 1mM). Esitatud on vähemalt kahekümne nelja paralleeli aritmeetilised keskmised koos 95% usalduspiiridega ja homogeensusrühmadega. Homogeensusrühmade ühesuguste tähtede korral ei esine keskmiste väärtuste vahel statistiliselt olulist erinevust ($p \geq 0,05$).

Tüvi F15 on ka defineeritud söötmetes metsiktüvest aeglasema kasvuga ning IPTG lisamine söötmesse aeglustab veelgi F15 kasvu. Eelnevatest katsetest on teada, et biofilmi biomass on F15+IPTG üldiselt suurem kui PSm (eriti LB-s) (Jakovleva jt. 2012, Moor jt. 2014, Puhm 2018). Aeglasem kasv justkui soodustaks biofilmi moodustumist, kuid sellega on vastuolus F15 kasvukiirus M9 IPTG-ga söötmes, mis on väiksem kui IPTG-ta variandis, lisaks on F15 kasvukiirus IPTG-ta LB söötmes madalam kui PSm-i kasvukiirus samades tingimustes(joonis 1), aga biofilmi biomass nendel variantidel erinevust pole (Puhm 2018). Seega planktiliste rakkude kasvukiirusel ja biofilmi biomassil ei ole otsest seost.

3.4.2. *P. putida* biomass LB-s ja M9 söötmetes

Lisaks kasvukiirusele mõõdeti tüvede PSm ja F15 maksimaalset optilist tihedust – MaxOD, mis väljendab bakteri võimet moodustada biomassi ehk kui palju substraadist anaboliseeritakse biomassiks.

ANOVA järgi bakteri maksimaalne biomass sõltub söötimest ($F=142,51$; $df=3$; $p<0,001$), tüvest ($F=11,83$; $df=1$; $p=0,001$) ja IPTG-st ($F=6,83$; $df=1$; $p=0,0095$). Bonferroni järeltestist selgus, et faktortunnusel „IPTG“ ei ole PSm biomassile olulist mõju ($p=1$; joonis 2). Üldiselt pole IPTG-l mõju ka F15 maxOD-le välja arvatud M9 söötmes, kus IPTG juuresolekul on F15 MaxOD 1,15 korda madalam kui IPTG-ta söötmes ($p<0,001$; joonis 2).



Joonis 2. *P. putida* tüvede PSm ja F15 maksimaalne biomass (OD₅₈₀) söötmetes LB, M9 glc CAA (M9), M9 glc 1,4% CAA (M9 1,4% CAA), M9 glc CAA trüptoon (M9+trüptoon). *Fis*-i üleekspressiooni indutseerimiseks lisati IPTG-d (lõppkontsentratsiooniga 1mM). Esitatud on vähemalt kahekümne nelja paralleeli aritmeetilised keskmised koos 95% usalduspiiridega ja homogeensusrühmadega. Homogeensusrühmade ühesuguste tähtede korral ei esine keskmiste väärtuste vahel statistiliselt olulist erinevust ($p\geq 0,05$).

Söötmeti moodustavad tüved biomassi erinevalt ning kõige rohkem M9 1,4% CAA söötmes (joonis 2). Kuna selles söötmes on suhteliselt kergesti omastatavad toitained (peamiselt aminohapped ja glükoos) siis bakteril kulub vähe energiat biomolekulide anabolismiks.

Kui võrrelda tüvesid, siis üldjoontes ei saa välja tuua, et üks tüvi moodustaks biomassi halvemini kui teine, ainult M9+trüptooni puhul on F15+IPTG variant teistest sama söötme variantidest madalama biomassiga (nt PSm M9+trüptoon+IPTG versus F15 M9+trüptoon+IPTG 1,2 korda; $p=0,0029$), teiste puhul statistilisi erinevusi tüvede vahel pole (joonis 2).

Planktiliste rakkude kasvukiirusel ja MaxOD-l pole biofilmi biomassi moodustamisega otsest seost. Seega *P. putida* puhul ei saa neid kahte eluvormi otseselt võrrelda, vaid peab erinevalt vaatama rakke, mis kasvavad planktiliselt ja sessiilselt.

3.4.3. *P. putida* biofilmi dünaamika LB-s ja M9 söötmetes

Fis-i biofilmi soodustav efekt avaldub M9 trüptooniga söötmes ja LB-s, kuid mitte M9 söötmes (Puhm 2018). Kuna need andmed on saadud 24 h biofilmi biomassi mõõtmistest, siis tekkis küsimus, mis toimub enne seda ajapunkti biofilmi arengu käigus. Mikroitiiterplaadil kasvanud bakterite biofilmi biomassi mõõtmise on lõpp-punkti meetod, mis ei võimalda biofilmi muutumist aja jooksul otseselt jälgida. Alternatiivne meetod biofilmi arengu mõõtmiseks on lahjendusterea põhise kasvukõvera kasutamine. See meetod põhineb eeldusel, et inokulaadi järjestikuste lahjenduste seeria annab kasvukõverad, mis on omavahel nihkes aja võrra, mis kulub kultuuril tuvastatava rakutiheduseni kasvamiseks. Seega suurema rakulahjendusega söötmes oleks kultuur eksponentsiaalses kasvufaasis samal ajal kui väiksema rakulahjendusega söötmes jõuaks bakterikultuur statsionaarsesse faasi. Samasugune lahjenduste rida kajastaks ka biofilmi moodustumist, st suurema lahjendusega kannudes oleks biofilm moodustumise alguses, väiksema lahjendusega kannudes oleks biofilm aga küpsemisjärgus. Selline lähenemisviis võimaldab mõõtmiste arvu vähendada ning samasuguse lahjenduste reaga proovide biofilmi lõpp-punkti mõõtmised saab omistada vastavatele ajapunktidele kasvukõveral. (Govantes 2018)

Esmalt on töös uuritud *P. putida* tüvede biofilmi biomassi dünaamikat üldiselt *General Linear Model*'i abil, hiljem täpsemad võrdlused söötmeti.

Võrreldes *P. putida* metsiktüve PSm-i biofilmi biomassi dünaamikat söötmetes, selgus, et faktortunnus „IPTG“ ei avalda PSm biofilmile olulist mõju ($F=0,459$; $df=1$; $p=0,498$; joonised 3A, 4, 6A, 7). See tulemus oli oodatav, sest IPTG-l ei tohikski olla mõju metsiktüve biofilmi biomassile. IPTG iseseisva mõju puudumine metsiktüve biofilmi moodustumisele on kooskõlas varem mõõdetud 4 ja 24 tunni biofilmide andmetega (Moor jt. 2014). Sellest saab järeldada, et IPTG iseseisvalt ei mõjuta *P. putida* biofilmi.

Faktortunnuse „sööde“ mõju PSm biofilmile on statistiliselt oluline ($F=22,096$; $df=3$; $p<0,001$), viidates sellele, et bakteri biofilmi biomass sõltub kasvukeskkonnast. Bonferroni järeltesti alusel joonistus välja kaks gruppi, mille metsiktüve biomasside vahel on statistiliselt oluline erinevus ($p<0,001$): 1) söötmed M9 ja M9 1,4% CAA (joonised 4 ja 6A) ning 2) söötmed LB ja M9+trüptoon (joonised 3A ja 7). Ehk teisisõnu, trüptooni esinemine söötmes põhjustas PSm-i biofilmi biomassi suurenemist (joonised 3A ja 7).

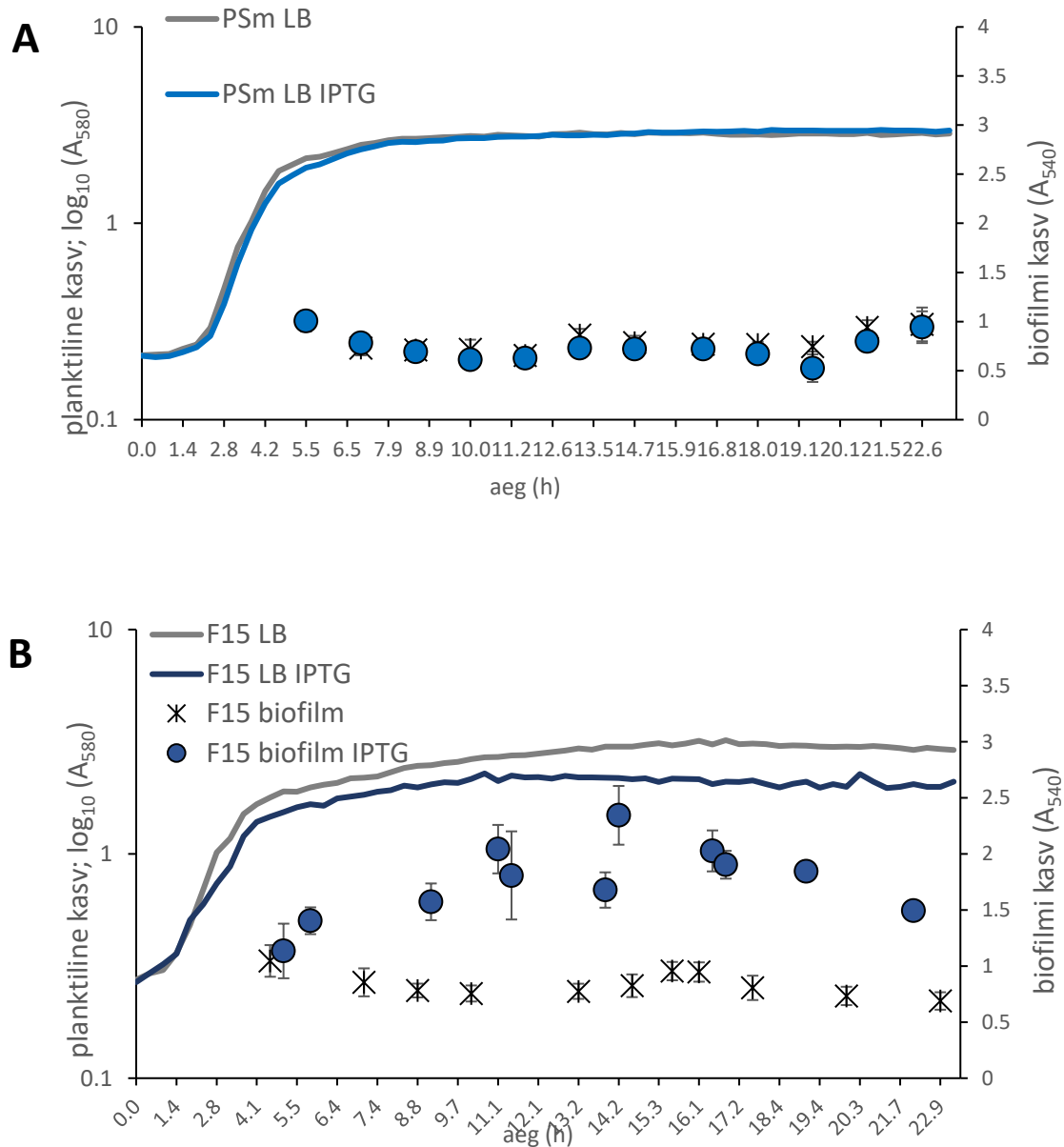
Kui analüüsida *P. putida* tüve F15, milles on *fis* üleekspresseeritav IPTG abil, biofilmi dünaamikat söötmetes, siis faktortunnuse „IPTG“ mõju biomassile on statistiliselt oluline ($F=38,832$; $df=1$; $p<0,001$). F15 tüve biofilmi moodustumist mõjutab statistiliselt olulisel määral faktortunnus „sööde“ ($F=16,022$; $df=3$; $p<0,001$; joonised 3B, 5, 6B, 8). Faktori „aeg“ toime tüve F15 biofilmile on samuti statistiliselt oluline ($F=31,809$; $df=1$; $p<0,001$), seega biofilm on ajas muutuv. Kokkuvõtvalt, trüptooni olemasolu söötmes mõjutab *P. putida* biofilmi statistiliselt olulisel määral. Lisaks *fis*-üleekspressioonitüves F15 ilmneb nn *Fis*-i võimendav efekt ainult trüptooni olemasolul söötmes.

3.4.3.1. *P. putida* biofilmi dünaamika LB-täissöötmes

P. putida metsiktüüpi tüve PSm biofilmi biomass LB-täissöötmes püsib eriliste muutusteta 6. tunnist kuni testiperioodi lõpuni 24 tunni pärast (joonis 3A).

Tüve F15 biofilmi kujunemine IPTG-ta LB söötmes on sarnane metsiktüvele (joonis 3). IPTG mõjutab F15 biofilmi statistiliselt olulisel määral, see tähendab *fis*-i üleekspressiooni tingimustes

biofilmi biomass suureneb umbes kaks korda ning küpses biofilmis on Fis-i efekt olemas ($p < 0,001$; joonis 3B).



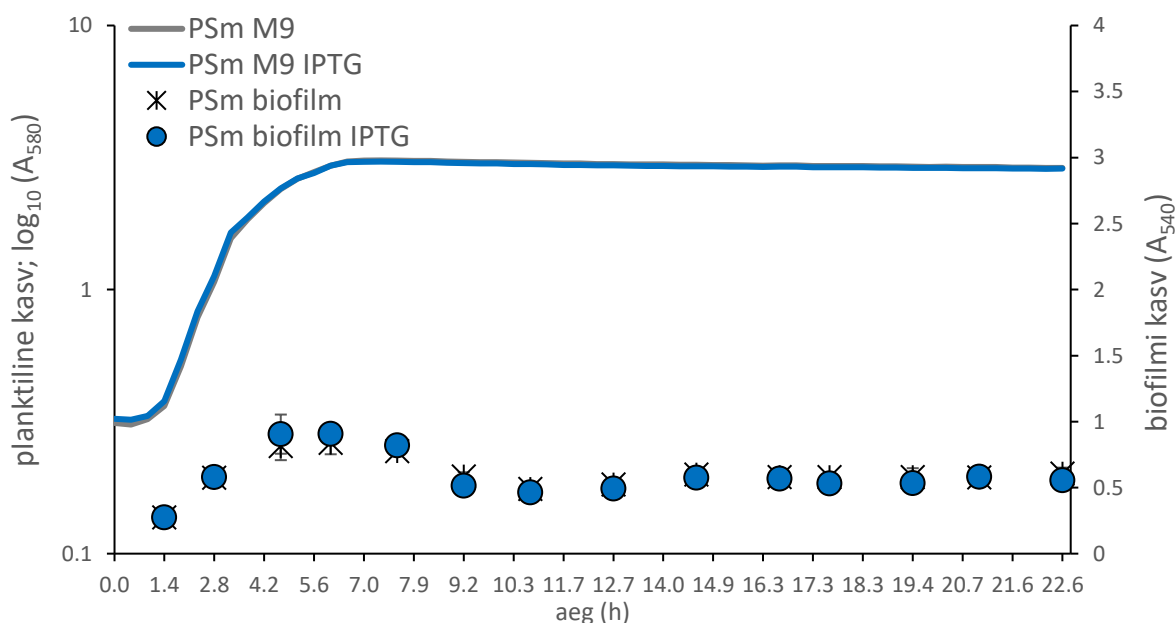
Joonis 3. *P. putida* kasv ja biofilmi dünaamika LB-täissöötmes. Tüvede PSm (A) ja F15 (B) kasvukõverad IPTG-ta (hall pidevjoon) ja 1mM IPTG-ga (sinine pidevjoon) ning biofilm IPTG-ta (tärnid) või 1mM IPTG juuresolekul (ringid) LB-s. Toodud on kahekümne nelja paralleeli aritmeetilised keskmised koos 95% usalduspiiridega, kasvukõvera sagedase mõõtmise tulemusena (7min intervall) ei ole usalduspiire kasvukõveratele pandud.

3.4.3.2. *P. putida* biofilmi dünaamika M9 söötmes

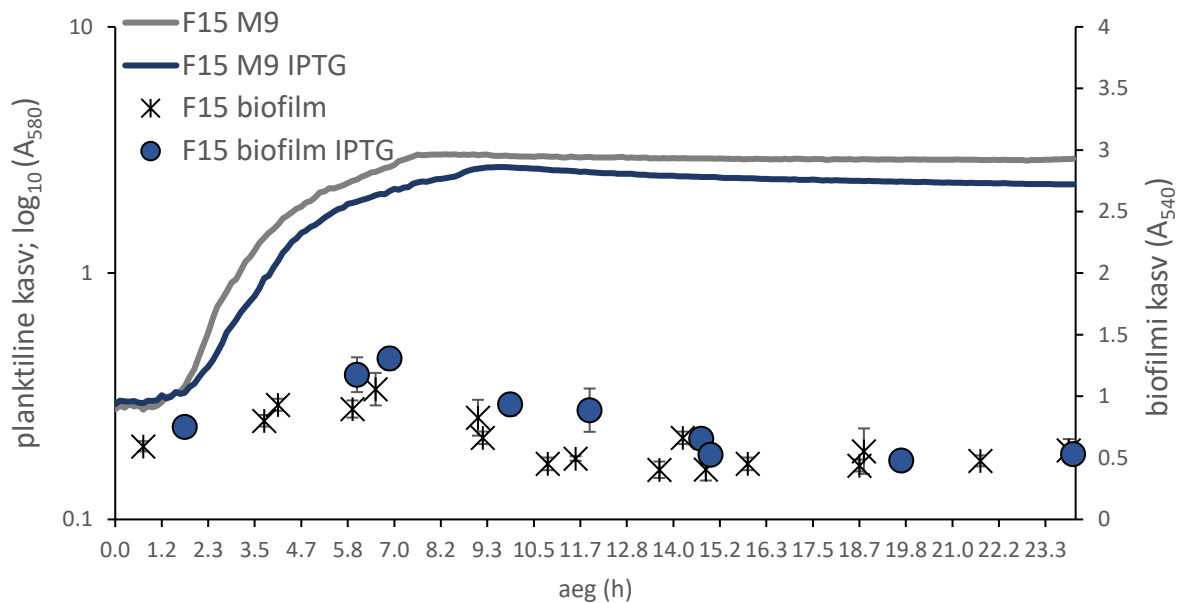
M9 söötmes on PSm-i biofilmi biomassile faktorite „sööde“ ja „aeg“ koosmõju statistiliselt oluline ($F=13,205$; $df=3$; $p<0,001$), mis näitab, et metsiktüve biofilmi moodustumine on ajas muutuv, sõltudes samas keskkonnast.

Tüve PSm biofilmi biomass suurenes defineeritud M9 söötmes esimese kuue tunni jooksul, millele järgnes biofilmi hulga kahekordne vähenemine 10. tunniks ja stabiilsuse saavutamine 24. tunnini (joonis 4). Selline tulemus oli oodatav, sest *P. putida* biofilmi lagunemist umbes poole võrra on varasemalt M9-söötmes kirjeldatud (Matilla jt. 2011b).

Tüve F15 biofilmi kasv ja küpsemine IPTG-ta söötmes on sarnane metsiktüvele (joonised 4 ja 5). Faktortunnusel „IPTG“ statistiliselt oluline mõju puudub ($p=1$; joonis 5). *Fis*-i üleekspressioon ei suurenda biofilmi biomassi hulka M9 söötmes ning küpses biofilmis *Fis*-i biofilmi võimendavat efekti ei esine.



Joonis 4. *P. putida* kasv ja biofilmi dünaamika M9 glc CAA söötmes (M9). Tüve PSm kasvukõverad IPTG-ta (hall pidevjoon) ja 1mM IPTG-ga (sinine pidevjoon) ning biofilm IPTG-ta (tärnid) või 1mM IPTG juuresolekul (ringid) M9-s. Esitatud on kahekümne nelja paralleeli aritmeetilised keskmised koos 95% usalduspiiridega, kasvukõvera sagedase mõõtmise tulemusena (7min intervall) ei ole usalduspiire kasvukõveratele pandud.



Joonis 5. *P. putida* kasv ja biofilmi dünaamika M9 glc CAA söötmes (M9). Tüve F15 kasvukõverad IPTG-ta (hall pidevjoon) ja 1mM IPTG-ga (sinine pidevjoon) ning biofilm IPTG-ta (täpnid) või 1mM IPTG juuresolekul (ringid) M9-s. Esitatud on kahekümne nelja paralleeli aritmeetilised keskmised koos 95% usalduspiiridega, kasvukõvera sagedase mõõtmise tulemusena (7min intervall) ei ole usalduspiire kasvukõveratele pandud.

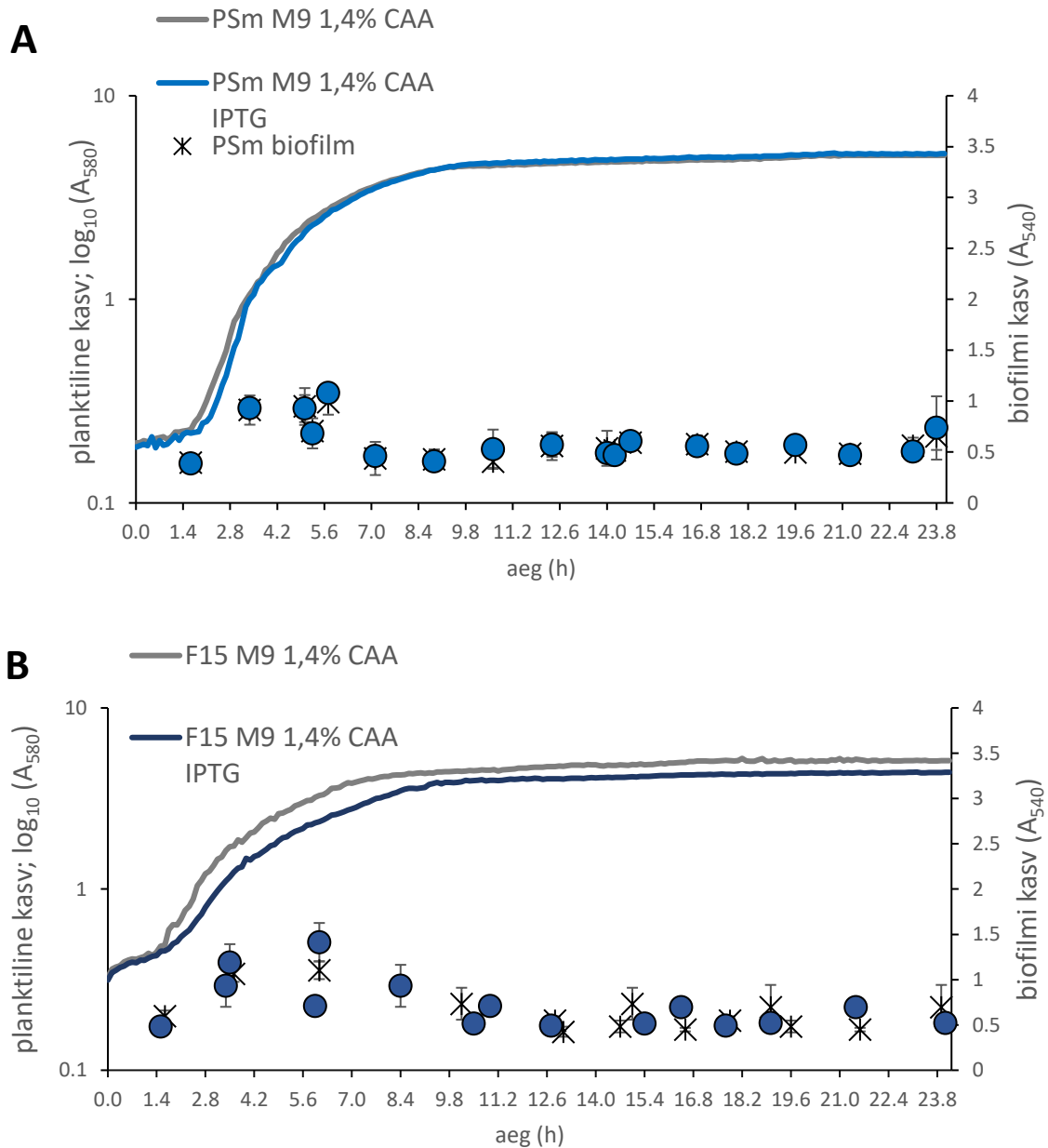
3.4.3.3. *P. putida* biofilmi dünaamika M9 1,4% CAA söötmes

Söötmes M9 1,4% CAA on *P. putida* metsiktüve PSm varajase biofilmi biomass suurem biofilmi arenemisfaasis, kuid väheneb 8 tunniks, sarnanedes PSm rakkude käitumisele M9 söötmes (joonised 4 ja 6A). Tüve PSm biofilmi dünaamika ei erine M9 ja M9 1,4% CAA söötmetes ($p=1$).

Tüve F15 biofilmi kasv ja küpsemine IPTG-ta söötmes on sarnane metsiktüvele PSm (joonis 6). Faktortunnusel „IPTG“ pole F15 biofilmi dünaamikale statistiliselt oluline mõju ($p=0,0905$; joonis 6B). Seega, Fis-i biofilmi võimendavat efekti M9 1,4% CAA söötmes ei esine.

Biofilmi kujunemine M9 1,4% CAA söötmes on sarnane biofilmi biomassi muutumisele M9 söötmes ja seda nii metsiktüve kui ka F15 korral (joonised 4, 5 ja 6). Need tulemused näitavad, et täiendava C-allika lisamine M9-söötmesse peamiselt aminohapete kujul ei muuda biofilmi

dünaamikat. Lisaks, Fis-i positiivne efekt biofilmile ei sõltu üldisest C- ja N-allika hulgast (antud juhul aminohapete hulgast).

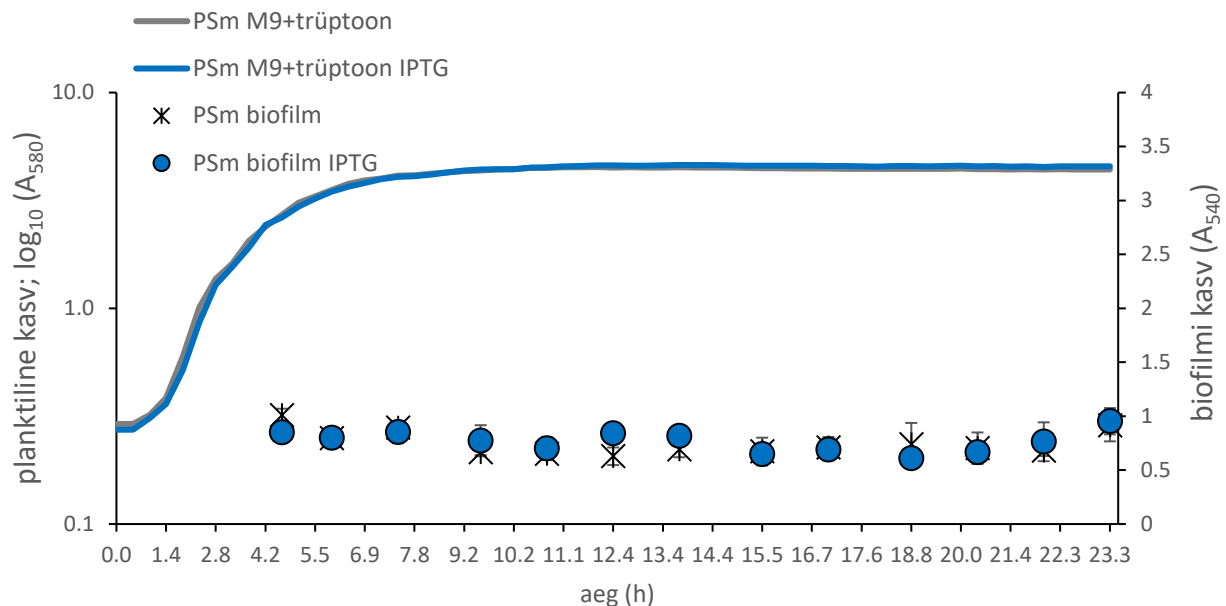


Joonis 6. *P. putida* kasv ja biofilmi dünaamika M9 glc 1,4% CAA söötmes (M9 1,4% CAA). Tüvede PSm (A) ja F15 (B) kasvukõverad IPTG-ta (hall pidevjoon) ja 1mM IPTG-ga (sinine pidevjoon) ning biofilm IPTG-ta (tärnid) või 1mM IPTG juuresolekul (ringid) M9 1,4% CAA-s. Toodud on kahekümne nelja paralleeli aritmeetilised keskmised koos 95% usalduspiiridega, kasvukõvera sagedase mõõtmise tulemusena (7min intervall) ei ole usalduspiire kasvukõveratele pandud.

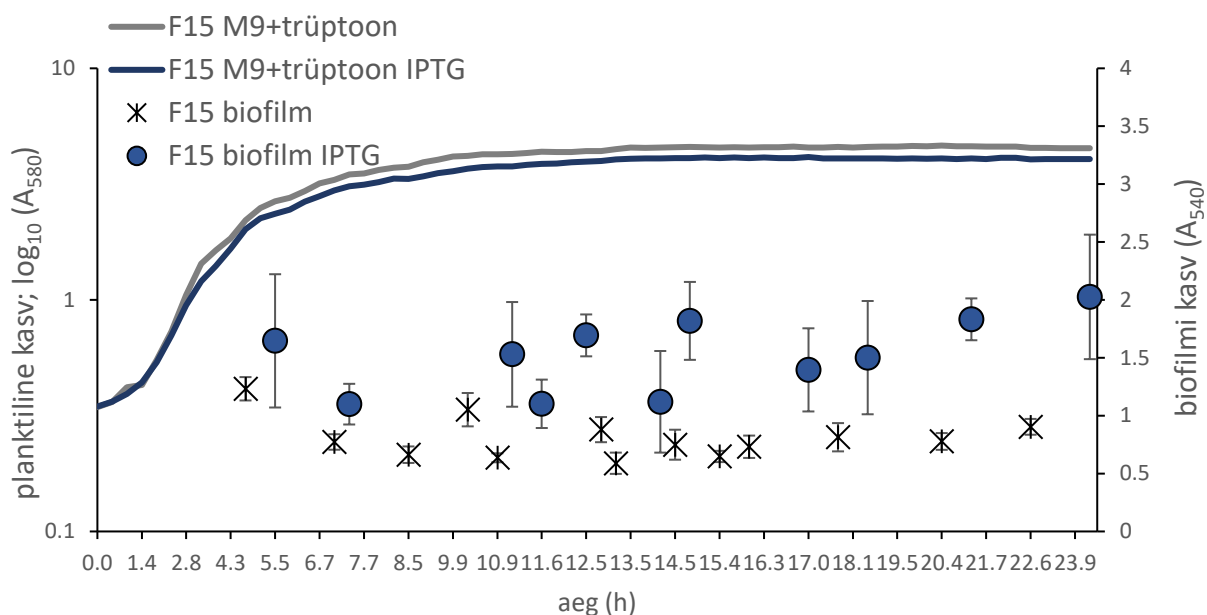
3.4.3.4. *P. putida* biofilmi dünaamika M9 trüptooniga söötmes

P. putida metsiktüve PSm biofilmi kujunemine on võrreldav rakkude käitumisega LB-täissöötmes, st biofilmi biomassis ei ole erinevust M9+trüptoon ja LB-s ($p=0,264$; joonised 3A ja 7). Tüve PSm biofilmi biomass M9+trüptoon söötmes on statistiliselt oluliselt erinev metsiktüve biofilmist söötmetes M9 (M9+trüptoon *versus* M9; $p<0,001$; joonised 4 ja 7) ning M9 1,4% CAA (M9+trüptoon *versus* M9 1,4% CAA; $p<0,001$; joonised 6A ja 7), see tähendab, et trüptooni olemasolu söötmes suurendas metsiktüve biofilmi biomassi.

Tüvi F15 IPTG-ta söötmes moodustab biofilmi sarnaselt metsiktüvele (joonised 7 ja 8). *Fis*-i üleekspressioonitüve korral põhjustab IPTG lisamine söötmesse statistiliselt olulist erinevust biofilmi biomassis ($p<0,001$; joonis 7), see tähendab söötmes M9+trüptoon on *fis*-i üleekspressioonil biofilmi soodustav efekt. *Fis*-i üleekspressiooni mõju biofilmile on sarnane LB ja M9+trüptooniga söötmetes (LB+IPTG *versus* M9+trüptoon+IPTG; $p=0,437$; joonised 3B ja 8) ning eristab neid kõigist teistest söötmevariantidest ($p<0,001$; joonised 3 kuni 8).



Joonis 7. *P. putida* kasv ja biofilmi dünaamika M9 glc CAA trüptooniga söötmes (M9+trüptoon). Tüve PSm kasvukõverad IPTG-ta (hall pidevjoon) ja 1mM IPTG-ga (sinine pidevjoon) ning biofilm IPTG-ta (tärnid) või 1mM IPTG juuresolekul (ringid). Esitatud on kahekümne nelja paralleeli aritmeetilised keskmised koos 95% usalduspiiridega, kasvukõvera sagedase mõõtmise tulemusena (7min intervall) ei ole usalduspiire kasvukõveratele pandud.



Joonis 8. *P. putida* kasv ja biofilmi dünaamika M9 glc CAA trüptooniga söötmes (M9+trüptoon). Tüve F15 kasvukõverad IPTG-ta (hall pidevjoon) ja 1mM IPTG-ga (sinine pidevjoon) ning biofilm IPTG-ta (tärnid) või 1mM IPTG juuresolekul (ringid). Esitatud on kahekümne nelja paralleeli aritmeetilised keskmised koos 95% usalduspiiridega, kasvukõvera sagedase mõõtmise tulemusena (7min intervall) ei ole usalduspiire kasvukõveratele pandud.

Kokkuvõtvalt võib välja tuua, et trüptooni lisamine söötmesse soodustab nii *P. putida* metsiktüve PSm-i biofilmi kui ka *fis*-i üleekspressioonitüve F15 biofilmi. Niinimetatud *Fis*-i võimendav efekt ilmneb juba üsna varakult ning vaatamata erinevale kasvukiirusele võib 24-tunnist biofilmi biomassi mõõtmist pidada usaldusväärseks. *P. putida* biofilm stabiliseerub umbes 8. tunnil ning 24. tunniks on tegemist kõigil variantidel küpse biofilmiga ning *fis*-i üleekspressiooni mõju biofilmi biomassile on stabiilne. Töö mahu vähendamiseks on edaspidi kasutatud 24. tunni biofilmi biomassi mõõtmist.

3.4.4. Polüpeptiidide mõju *P. putida* 24 h biofilmile

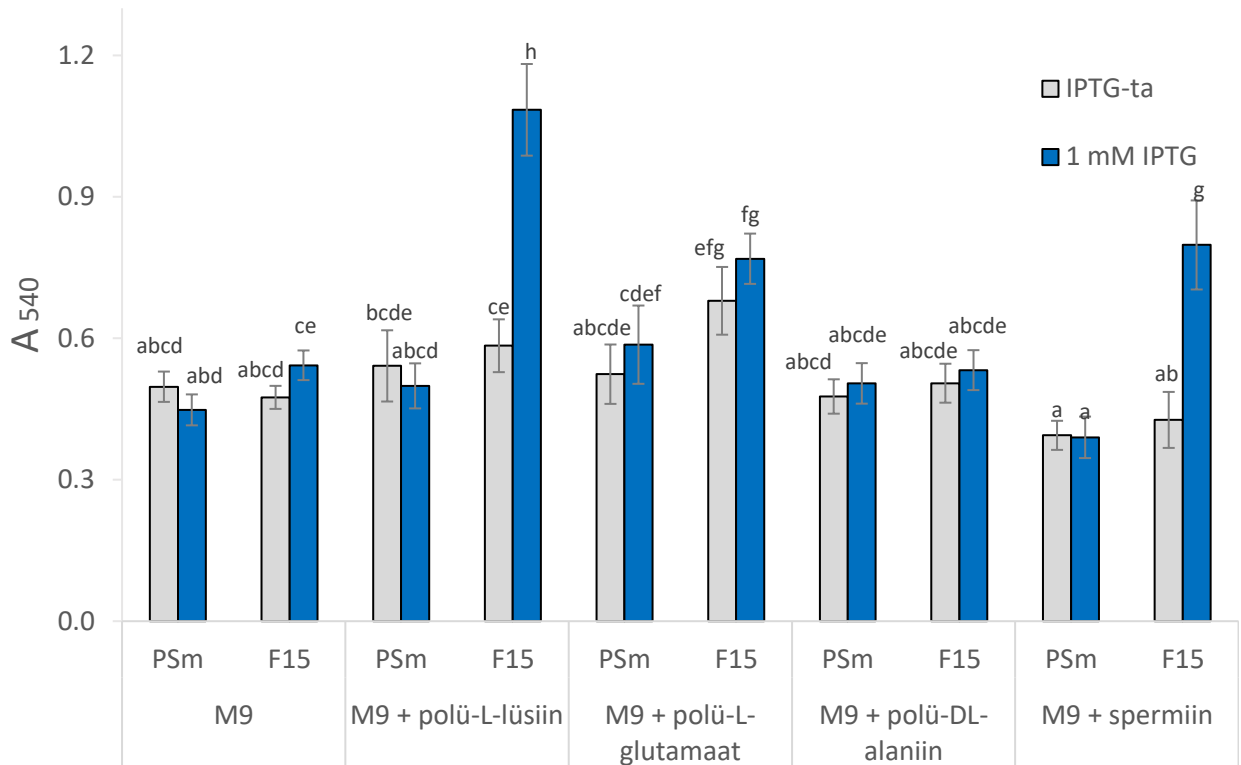
Kuna trüptooni mõju *P. putida* biofilmi biomassile oli selgelt tuvastatav nii metsiktüvel PSm kui ka *fis*-i üleekspressioonitüvel F15, siis asendati trüptoon ekstratsellulaarsete peptiididega. Kui tegemist on peptiidide mõjuga biomassile, siis peaks ekstratsellulaarse faktori positiivne efekt säiluma.

Esmalt kasutati peptiidide segu, mis saadi TÜTI peptiidikeemia teadurilt Ly Porosk. Kasutati puhastatud peptiidide segu umbes samas kontsentratsioonis nagu on trüptoon LB-s (andmeid pole toodud). Peptiidide segud andsid erinevaid tulemusi, osa segusi võimendas biofilmi ning esines ka *Fis*-i biofilmi võimendav efekt, kuid osa pärssis biofilmi (andmeid pole toodud). Kuna peptiidide segu koosseisu polnud võimalik kindlaks teha, siis otsustati asendada peptiidide segu kommertsiaalsete polüpeptiididega: positiivse laenguga polü-L-lüsiin, negatiivse laenguga polü-L-glutamaat ja laenguta polü-DL-alaniin (tabel 1). Kuna eelnevalt on töös kasutatud trüptooni, mis on saadud trüpsiiniga kaseiini lõikamisel, siis peptiidide valik tehti aminohapete laengu järgi, mis võiks mimikeerida trüpsiiniga kaseiini lõikamist. Trüpsiin lõikab valke arginiini või lüsiini järelt (<http://www.worthington-biochem.com>), mis jätab peptiididele positiivse laenguga otsa. Seetõttu valiti edaspidiseks tööks polüpeptiidid, mis oleks positiivse või negatiivse laenguga ja laenguta. Lisaks kasutati polüamiini spermiin, millel on positiivne laeng, kuid erinevalt peptiididest puuduvad ketoonrühmad (ahel ei moodustu karboksüülrühma abil; tabel 1).

M9 söötmele lisatud peptiidid ja spermiin mõjutavad oluliselt *P. putida* biofilmi biomassi ($F=48,571$; $df=4$; $p<0,001$). Statistiliselt olulised on ka faktortunnused „IPTG“ ($F=68,555$; $df=1$; $p<0,001$) ja „tüvi“ ($F=146,192$; $df=1$; $p<0,001$). Bonferroni järeltest näitas, et IPTG-l ei ole statistiliselt eristavat mõju metsiktüve PSm-i biofilmile üheski söötmevariandis ($p=1$; joonis 9). Polü-L-glutamaat suurendab tüve F15 biofilmi biomassi (F15 M9 versus F15 M9+polü-L-glutamaat; $p<0,001$; joonis 9), kuid *Fis*-i efekti ei ole. IPTG statistiliselt oluline mõju F15 biofilmile on märgatav M9 söötmes, millele on lisatud spermiini (M9+spermiin; $p<0,001$) või polü-L-lüsiini (M9+polü-L-lüsiin; $p<0,001$), see tähendab, et *Fis*-i efekt on olemas (joonis 9).

Katset korraldati polü-D-lüsiiniga (1000-5000 Da), mis sarnaselt polü-L-lüsiinile võimendas biofilmi biomassi, kui *fis* oli üleekspressseeritud (andmeid pole toodud). Mis tähendab, et biofilm

ei sõltu polülüsiini isovormist, mis omakorda viitab sellele, et polülüsiini ei metaboliseerita, vaid kasutatakse kui ekstratsellulaarset polümeeri.



Joonis 9. *P. putida* tüvede PSm ja F15 24 tunni biofilmi biomass, mis on moodustunud IPTG-ta või 1 mM IPTG juuresolekul M9 glc CAA söötmes (M9) ja lisanditega: polü-L-lüsiin, polü-L-glutamaat, polü-DL-alaniin või spermiin (lõppkontsentratsiooniga 0,4 g/l). Y-telg näitab ekstraheeritud kristallvioleti optilist tihedust 540 nm juures (A₅₄₀), mida kasutati biofilmi biomassi määramiseks. Esitatud on vähemalt kaheksa paralleeli aritmeetilised keskmised koos 95% usalduspiiridega ja homogeensusrühmadega. Homogeensusrühmade ühesuguste tähtede korral ei esine keskmiste väärtuste vahel statistiliselt olulist erinevust ($p \geq 0,05$).

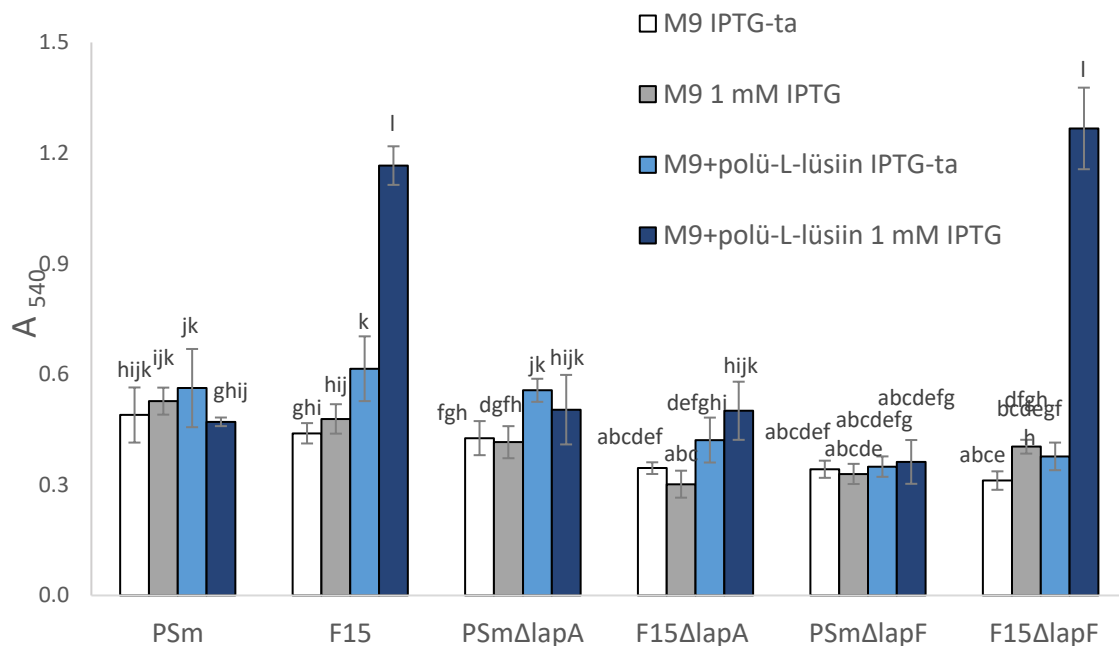
Kokkuvõtvalt, ekstratsellulaarsetel peptiididel on mõju *P. putida* biofilmile. *Fis*-i üleekspressioonitingimustes suurendab biofilmi biomasse ekstratsellulaarne polülüsiin ja polüamiin spermiin, mis viitab positiivse laenguga biopolümeeri tähtsusele keskkonnas.

3.4.5. Polü-L-lüsiini mõju *P. putida* *lapA* ja *lapF* mutantsete tüvede 24 h biofilmile

Kuna LapA on *P. putida* oluline kleepvalk, mis alustab adhesiooni (Espinosa-Urgel jt. 2000) ning sellega analoogne adhesiin LapF on oluline küpse biofilmi moodustumiseks, siis selgitamaks, kas Fis-i efektil polülüsiiniga söötmes on seos bakteri adhesioonivalkudega LapA ja LapF, mõõdeti *lapA* ja *lapF* deletsiooniga tüvede 24 tunni biofilmi biomassi. M9 söötmesse lisati lisandina polü-L-lüsiini, kontrollile polülüsiini ei lisatud.

Ootuspäraselt ei ole IPTG-l iseseisvat mõju metsiktüve PSm biofilmile ($p=1$; joonis 10).

LapA deletsioon ei mõjuta metsiktüve PSm biofilmi M9-s ega ka polü-L-lüsiiniga söötmes ($p=1$; joonis 10). Fis-i biofilmi võimendav efekt avaldub M9+polü-L-lüsiin+IPTG söötmes kasvanud tüvedes F15 ja F15 Δ lapF, see tähendab LapF-i puudumine ei mõjuta Fis-i efekti oluliselt. Seevastu *lapA* deleteerimine tüves F15 kaotab ära Fis-i biofilmi soodustava efekti.



Joonis 10. *P. putida* tüvede PSm, F15, PSm Δ lapA, F15 Δ lapA, PSm Δ lapF ja F15 Δ lapF 24 tunni biofilmi biomass, mis on moodustunud IPTG-ta või 1 mM IPTG juuresolekul M9 glc CAA söötmes (M9) ja M9 glc CAA polü-L-lüsiiniga söötmes (M9+polü-L-lüsiin). Y-telg näitab ekstraheeritud kristallvioleti optilist tihedust 540 nm juures (A_{540}), mida kasutati biofilmi biomassi määramiseks. Esitatud on vähemalt kuueteistkümne paralleeli aritmeetilised keskmised koos 95% usalduspiiridega ja homogeensusrühmadega. Homogeensusrühmade ühesuguste tähtede korral ei esine keskmiste väärtuste vahel statistiliselt olulist erinevust ($p \geq 0,05$).

Tulemustest järeldub, et *Fis*-i üleekspressiooni biofilmi võimendav toime polülüsiiniga söötmes võib toimuda LapA kaudu.

3.6. Arutelu

Meie töögrupis uuritakse *Pseudomonas putida* biofilmi kujunemist ning eelnevate töödega on näidatud, et *P. putida* biofilmi tekkes on kesksel kohal globaalne regulaatorvalk Fis. Varasematest töödest selgus, et *fis*-i üleekspressioon soodustab *P. putida* biofilmi moodustumist LB täissöötmes, kuid mitte M9 glc CAA söötmes. Sellest tulemusest tekkis küsimus, miks Fis-i efekt on sõltuv söötimest ning kas sööde võiks mõjutada ka metsiktüve biofilmi.

LB sööde sisaldab vabu aminohappeid, erineva pikkusega peptiide, suhkruid, orgaanilisi happeid, vitamiine ja mikrotoitaineid (Sezonov jt. 2007, La Rosa jt. 2016, Molina jt. 2019). Kinnitumist soodustava koostisega sööde võib imiteerida nišši, mida bakter tavaliselt koloniseerib. *P. putida* koloniseerib taimejuuri ning moodustab seal biofilmi. Risosfääris on põhiliseks toitainete allikaks taime juureeritised, mis sisaldavad orgaanilisi happeid, suhkruid, aminohappeid ja peptiide (Bertin jt. 2003). Taime kasvades vabanevad übritsevasse mulda ka vanad taimerakud, mis omakorda rikastavad risosfääri erinevate, sealhulgas peptiidsete ühenditega (Bais jt. 2006, Ahmad jt. 2011). Seega risosfäär suudab pakkuda bakterile toitaineid rakkude kasvuks ning ühtlasi ka materjali biofilmi matriksi ülesehitamiseks või tugevdamiseks.

LB-s sisalduvad aminohapped ja peptiidid on pärit pärmiekstraktist ja trüptoonist. M9 söötmesse trüptooni lisamine tekitab *fis*-i üleekspressiooni biofilmi soodustava efekti sarnaselt LB-ga (Puhm 2018) ning suureneb ka *P. putida* metsiktüve PSm biofilmi biomass (andmeid pole toodud). M9 söötmes CAA sisalduse viimine 1,4%-liseks tähendab arvutuslikult sarnast C- ja N-allika kontsentratsiooni nagu LB-s ja seega rohkem toitaineid rakkude kasvuks, kuid biofilmis Fis-i efekti see ei anna (joonised 5 ja 6) ega suurenda ka metsiktüve PSm-i biomassi (joonis 6).

Kaseiini happeline hüdrolüüs (CAA tootmine) tekitab suuremal hulgal aminohappeid ja vähe peptiide, aga trüptoon saadakse kaseiini ensümaatilisel lagundamisel, mille tulemusena tekivad peptiidid ning vähesel määral vabu aminohappeid (Zimbro 2009). Seega trüptoon sisaldab suuremas koguses peptiide kui CAA. See viitab rakuväliste peptiidide osalusele *P. putida* biofilmi moodustumises. Rakud ei tarbi ainult aminohappeid, vaid ka peptiide ning peptiidi transpordiga võib rakk säästa energiat kasvamiseks. Sellisel juhul peaks kasvukiirus tõusma, kuid M9 söötmesse trüptooni lisamine ei kiirenda metsiktüve kasvu (PSm M9 versus PSm M9+trüptoon; joonis 1), küll aga maksimaalset biomassi (PSm M9 versus PSm M9+trüptoon; joonis 2). *Fis*-i üleekspressiooni

korral on *P. putida* kasvukiirus võrreldav söötmetes M9 ja M9+trüpton (F15 M9+IPTG versus F15 M9+trüpton+IPTG; joonis 1), aga Fis-i biofilmi võimendav efekt avaldub ainult viimases (joonised 5 ja 8). Siit järeldub, et kasvukiiruse ja biofilmi biomassi vahel seos puudub. Trüptoniga söötmesse lisandunud peptiidid soodustavad biofilmi moodustumist, kuid mitte lisatoitainena, vaid arvatavasti maatriksi osana.

Kirjandusest on teada, et LB-s kasvades *P. putida* biofilmi biomass suureneb kiiresti umbes 6—10 tundi pärast pinnale kinnitumist ja seejärel biomass väheneb (Yousef-Coronado jt. 2008, Gjermansen jt. 2010, Yousef-Coronado jt. 2011, Moor jt. 2014). Sellest ajendatuna tekkis küsimus, milline on *P. putida* biofilmi dünaamika M9 söötmes nii metsiktüve kui ka *fis*-i üleekspressioonitüve korral. Eriti huvitas vastus küsimusele, kas M9 söötmes ei ole Fis-i efekti 24-ndal tunnil lihtsalt enam näha või ei ole seda kunagi tekkinudki. Lisaks kaasati võrdlusesse söötmed M9 1,4% CAA ja M9+trüpton. Biofilmi dünaamika iseloomustamiseks kasutati lahjenduste seeriat ja biofilmi mõõtmisi erinevate ajapunktide juures, mis valiti vastavalt tüvede kasvukiirustele. Selline lahjenduste real põhinev mõõtmine annab piisava efektiivsusega edasi paikse populatsiooni biofilmi kujunemist ja küpsemist. Tulemustest selgus, et M9 söötmes kasvades *P. putida* biofilmi biomass suureneb kiiresti, kuid 6.—8. tunni järel väheneb ja seejärel jääb stabiilseks 24. tunnini (joonis 4). *Fis*-i üleekspressiooni korral M9-s biofilm väheneb peale 10. tundi ning Fis-i biofilmi võimendavat efekti ei esine (joonis 5). Seega, söötmes M9 pole *fis*-i üleekspressioonil biofilmi biomassile mõju algusest peale. Kindlalt võib väita ka seda, et 24. tunni biofilmid on omavahel võrreldavad ning võimalik Fis-i positiivne mõju on stabiilne ning mõõdetav ka 24. tunnil.

Fis-i üleekspressiooni biofilmi võimendav efekt on seotud trüptonis sisalduvate peptiididega. Paraku on trüptonis peptiidide segu, mille täpne koostis ei ole üheselt teada. Kas Fis-i efekti tekkimiseks on oluline peptiidi primaarjärjestus, laeng või pikkus? TÜTI-st saadud ja töös kasutatud kolmest peptiidist üks suurendas biofilmi biomassi 3 korda ja teised kaks vähendasid biofilmi 2 korda (andmeid pole esitatud). See küll kinnitas arvamust, et peptiidid mõjutavad biofilmi ja nende mõju on väga erinev, aga ka siin sai takistuseks täpse koostise puudumine. Seepärast valiti võrdlusesse kommertsiaalsed peptiidid, nagu positiivse laenguga polü-L-lüsiin, negatiivse laenguga polü-L-glutamaat ja laenguta polü-DL-alaniin ning lisaks positiivselt laetud spermiin. *P. putida* 24 tunni biofilmi biomassi mõõdeti M9 glc CAA peptiididega

või spermiiniga söötmes. Polüalaniini lisamisel ei ole mõju biofilmi biomassile, polü-L-glutamaadi juuresolekul on biofilmi biomass suurem, kuid Fis-i efekt puudub (joonis 9). *Fis*-i üleekspressiooni biofilmi soodustavat efekti on näha rakkude kasvades M9+polü-L-lüsiin ja M9+spermiin söötmetes (joonis 9). Seniste andmete põhjal ei saa vastata küsimusele, kas oluline on peptiidi pikkus või täpne järjestus, mis soodustaks *P. putida* biofilmi tekkimist. Siiski, oluliseks võib osutuda valgulise komponendi laeng. Spermiinil paiknevad positiivsed laengud korrapäraste vahedega piki süsinikahelat. Oma laengu ja struktuuri tõttu võivad spermiin ja polülüsiini molekulid olla elektrostaatiliseks sillaks erinevate negatiivselt laetud polümeeride vahel (Xu ja Logan 2005, Shah ja Swiatlo 2008). Osiro ja kolleegid on pakkunud välja kineetilise mudeli, kus adhesiooniprotsess sõltub positiivselt laetud pinnavalkude ja negatiivselt laetud rakupinna elektrostaatilisest külgetõmbest (Osiro jt. 2004).

Pseudomonas putida rakk on negatiivselt laetud ja mõõdukalt hüdrofoobne (Jucker jt. 1996, Montag jt. 2012). *P. putida* biofilmi maatriksi tähtsamad komponendid on adhesioonivalgud LapA ja LapF, millest suurel määral oleneb bakteri pinnale kinnitumine ja hilisem rakkude omavaheline kontakt (Hinsa jt. 2003, Martínez-Gil jt. 2010). Siinkohal tekkis küsimus, kas polükatioonsed peptiidid soodustavad bakterirakkude adhesiooni valkude LapA või LapF kaudu, stabiliseerides maatriksi struktuuri. Selgitamaks, kas Fis-i efektil polülüsiiniga söötmes on seos bakteri adhesioonivalkudega LapA ja LapF, mõõdeti *lapA* ja *lapF* deletsiooniga tüvede 24 tunni biofilmi biomassi.

Fis-i üleekspressiooni biofilmi võimendav efekt avaldus polü-L-lüsiiniga söötmes tüvedes F15 ja F15Δ*lapF*, see tähendab Fis-i efekt ei sõltu LapF-i olemasolust. Samas *LapA* deletsioon tüves F15 kaotas Fis-i biofilmi soodustava toime (joonis 10). Seega on Fis-i biofilmi biomassi võimendava efekti jaoks tingimata vajalik adhesioonivalgu LapA olemasolu raku pinnal ja positiivse laenguga peptiidi leidumine keskkonnas, samas kui *P. putida* teine adhesioonivalk LapF pole oluline.

LapF-i vajadus sõltub kasvutingimustest ja *lapF*-i deletsioonil on negatiivne efekt ainult minimaalsöötmes või lahjendatud komplekssöötmes, see tähendab mitte rikkas söötmes nagu LB (Martínez-Gil jt. 2010). LapF muudab rakupinna hüdrofoobsemaks (Lahesaare jt. 2016), mis omakorda tihendab rakkudevahelist kontakti. Näiteks, Barros koos kolleegidega leidis, et LapF on *P. putida* 3-päevase biofilmi maatriksivalkudest arvukuselt 5–6. kohal (Barros *et al.* 2020). Seega LapF on oluline küpses biofilmis, kuid ei ole määrava tähtsusega biofilmi algetapis.

P. putida biofilmi moodustumise jaoks on vajalik LapA paiknemine bakteriraku pinnal, see on eriti oluline biofilmi moodustumise algetapis kontakti loomiseks ja kinnitumiseks pinnale (Espinosa-Urgel *et al.* 2000). Meie labori eelnevatest töödest on teada, et globaalne regulaator Fis aktiveerib *lapA* transkriptsiooni ning seega soodustab biofilmi moodustumist (Ainelo jt. 2017). Samuti on varasematest töödest teada, et *lapA* ekspressioon on sarnane LB-s ja defineeritud söötmes M9 nii metsiktüve kui ka *fis*-i üleekspressioonitüve korral (Moor 2013). See tähendab, et *fis*-i üleekspressioon suurendab LapA hulka mõlemas söötmes. LB-s, M9-s, M9 1,4% CAA ja M9+trüpton söötmes *fis*-i üleekspressiooni tingimustes kasvanud *P. putida* rakkudes on *lapA* transkriptsioon sarnane (Puhm 2018) ning LapA hulk võrreldaval tasemel (Riho Teras, avaldamata andmed). Seega *lapA* transkriptsioon ei sõltu söötimest, aga biofilmi hulk sõltub nii LapA-st kui ka keskkonnast. Fis-i üleekspressioon paneb rakud rohkem LapA-d tootma. Mida rohkem LapA-d raku pinnal, seda parem võimalus kinnituda ja moodustada biofilmi. Järelikult oleneb biofilmi teke ja tugevus sellest, kas keskkonnas on adhesioonivalgu seondumist soodustavaid komponente.

LapA on suur valk, mis oma kordusjärjestuste abil saab suunata ligandi siduva domeeni välismembraanist kaugemale ning võib seonduda erinevate substraatidega või maatriksi komponentidega distantsilt. LapA seondub nii biootilise kui ka abiootilise pinnaga ning seni ei ole kirjeldatud LapA-le spetsiifilist ligandi. LapA C-terminaalne domeen, kuhu kuulub ka ligandi siduv piirkond, seondub tõenäoliselt hüdrofiilsele pinnale ja kordusjärjestuste piirkond soodustab kinnitumist hüdrofoobsele substraadile (El-Kirat-Chatel jt. 2014, Boyd jt. 2014).

Töö tulemused viitavad sellele, et LapA võiks seonduda positiivselt laetud pinnaga. Polükatioon, näiteks polülüsiin võib olla sillaks negatiivselt laetud tahke pinna ning raku vahel, soodustades kinnitumist. Ekstratsellulaarsed (positiivselt laetud) peptiidid võivad olla seega biofilmi komponendiks, toimides struktuurielemendina biofilmi maatriksi moodustamisel.

Kuigi, siiski ei või alahinnata adhesioonivalgu olulisust ka biofilmi küpsemise hilisemas järgus maatriksi kooshoidjana (Gjermansen jt. 2010, Moor jt. 2014). Näiteks *Pseudomonas aeruginosa* biofilmi maatriksivalk CdrA seondub neutraalse eksopolüsahhariidiga Psl ja katioonse polüsahhariidiga Pel, stabiliseerides maatriksi terviklikkust ja biofilmi struktuuri (Borlee jt. 2010, Reichhardt jt. 2020). LapA on oluline *P. putida* biofilmi maatriksi komponent, kuid maatriksi kujunemises osalevad peale membraaniga seotud valkude ka muud eksopolümeerid. *P. putida*

valk LapA võib toimida nii üldise adhesiinina erinevate pindade suhtes kui potentsiaalselt olla vahelüli bakterite ja spetsiifilisemate eksopolümeeride vahel. Seda, kas LapA seondub peptiididega ainult kindla domeeni piirkonnaga, saaks kontrollida vastava mutatsiooniga bakteritüves.

Kokkuvõtteks, *P. putida* valk LapA on vajalik bakteri kinnitumiseks pinnaga ja biofilmi moodustumiseks, seondudes tõenäoliselt positiivselt laetud pinnaga. See töö näitas, et *fis*-i üleekspressiooni tingimustes moodustab *P. putida* rohkem biofilmi siis, kui keskkonnas on ekstratsellulaarseid peptiide, mille seondumine pinnavalguga LapA tugevdab biofilmi matriksi struktuuri ning seeläbi suurendab selle püsimist tingimustes, mis pigem soodustavad metsiktüve biofilmi biomassi vähenemist.

Kokkuvõte

Meie labori eelnevate töödega on näidatud, et globaalne regulaator Fis soodustab *Pseudomonas putida* biofilmi moodustumist, suurendades adhesioonivalgu LapA hulka. Fis-i biofilmi soodustav efekt ilmneb LB täissöötmes, kuid see puudub defineeritud M9 glc CAA söötmes. Söötmete võrdlus viitas sellele, et Fis-i efekt biofilmile sõltub söötmes peptiidse komponendi juuresolekust. Selles töös püstitati hüpotees, et ekstratsellulaarsed peptiidid soodustavad *P. putida* biofilmi kujunemist. Töö eesmärgiks oli selgitada, kas Fis-i biofilmi soodustav toime sõltub ekstratsellulaarsetest peptiididest ning kas peptiidid mõjutavad biofilmi adhesioonivalkude LapA ja LapF-i kaudu. Lisaks vaadeldi *P. putida* biofilmi dünaamikat neljas söötmes. Saadud tulemused on kokku võttes järgmised:

- *Pseudomonas putida* biofilm on dünaamiline, sõltudes ajast ja söötimest
- *P. putida* metsiktüve biofilmi biomass sõltub keskkonnas olevatest peptiidide segust (trüptoon)
- Fis-i ülekspressiooni biofilmi võimendavate tingimuste korral on soodustatud *P. putida* biofilmi biomassi püsimine
- Fis-i ülekspressiooni biofilmi võimendav efekt ilmneb polükatioonse peptiidi olemasolul bakteri kasvukeskkonnas.
- Fis-i ülekspressiooni biofilmi soodustav toime käib adhesioonivalgu LapA kaudu
- LapF-i puudumine ei mõjuta Fis-i efekti avaldumist

Summary

Pseudomonas putida is a plant growth-promoting bacterium that colonizes plant roots and forms a biofilm. *P. putida* produces the adhesive protein LapA to form biofilm on plant roots. Previous work in our laboratory has shown that the global regulator Fis (factor for inversion stimulation) promotes biofilm formation in *P. putida* by increasing the amount of LapA. The biofilm-promoting effect of Fis is present in complete LB medium, but is absent in the defined M9 medium. Comparison of the media indicated that the effect of Fis on the biofilm depended on the presence of the peptide component in the medium. In this work, it was hypothesized that extracellular peptides promote *P. putida* biofilm formation. The aim of this study was to elucidate whether the biofilm-promoting effect of Fis is dependent on extracellular peptides and whether it is related to the adhesion proteins LapA and LapF. Additionally, the dynamics of *P. putida* biofilm in different media was observed. The results can be summarized as follows:

- *Pseudomonas putida* biofilm is dynamic depending on time and medium
- The biofilm-enhancing effect of Fis overexpression occurs in the presence of a polycationic peptide in a bacterial growth medium.
- Fis overexpression enhances biofilm formation through LapA
- The deletion of *lapF* from F15 does not affect the Fis-enhanced biofilm

Tänu sõnad

Suur aitäh Ly Poroskile peptiidide eest.

Kõige soojemate sõnadega tahan tänada kõiki laborikaaslasi, kes on nõu ja jõuga abiks olnud, igati toetanud ning olnud alati suurepäraseks vestluspartnerid.

Minu eriline tänu ja kummardus juhendajale Riho Terasale, suure vaeva nägijale nii õpetussõnade ja julgustamise kui ka meie töögrupi toredate väljasõitude korraldamise eest.

Aitäh teile.

Kasutatud kirjandus

Acemel RD, Govantes F, Cuetos A. 2018. Computer simulation study of early bacterial biofilm development. *Scientific Reports* 8: 5340.

Ahmad F, Husain FM, Ahmad I. 2011. Rhizosphere and Root Colonization by Bacterial Inoculants and Their Monitoring Methods: A Critical Area in PGPR Research. Ahmad I, Ahmad F, Pichtel J (toim.). *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*, lk. 363–391. Springer, New York, NY.

Ainelo H, Lahesaare A, Teppo A, Kivisaar M, Teras R. 2017. The promoter region of *lapA* and its transcriptional regulation by *Fis* in *Pseudomonas putida*. *PLOS ONE* 12: e0185482.

Azeredo J, Oliveira R. 2000. The role of exopolymers in the attachment of *sphingomonas paucimobilis*. *Biofouling* 16: 59–67.

Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 233–266.

Barros CHN, Devlin H, Hiebner DW, Vitale S, Quinn L, Casey E. 2020. Enhancing curcumin's solubility and antibiofilm activity via silica surface modification. *Nanoscale Advances* 2: 1694–1708.

Belda E, Heck RGA van, Lopez-Sanchez MJ, Cruveiller S, Barbe V, Fraser C, Klenk H-P, Petersen J, Morgat A, Nikel PI, Vallenet D, Rouy Z, Sekowska A, Santos VAPM dos, Lorenzo V de, Danchin A, Médigue C. 2016. The revisited genome of *Pseudomonas putida* KT2440 enlightens its value as a robust metabolic chassis. *Environmental Microbiology* 18: 3403–3424.

Bernal P, Allsopp LP, Filloux A, Llamas MA. 2017. The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopathogens. *The ISME Journal* 11: 972–987.

Bertani G. 1951. STUDIES ON LYSOGENESIS I. *Journal of Bacteriology* 62: 293–300.

Bertin C, Yang X, Weston LA. 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil* 256: 67–83.

Blanco-Romero E, Redondo-Nieto M, Martínez-Granero F, Garrido-Sanz D, Ramos-González MI, Martín M, Rivilla R. 2018. Genome-wide analysis of the *FleQ* direct regulon in *Pseudomonas fluorescens* F113 and *Pseudomonas putida* KT2440. *Scientific Reports* 8: 1–13.

Bolwerk A, Lagopodi AL, Wijfjes AHM, Lamers GEM, Chin-A-Woeng TFC, Lugtenberg BJJ, Bloemberg GV. 2003. Interactions in the Tomato Rhizosphere of Two *Pseudomonas* Biocontrol Strains with the Phytopathogenic Fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 983–993.

Borlee BR, Goldman AD, Murakami K, Samudrala R, Wozniak DJ, Parsek MR. 2010. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Molecular Microbiology* 75: 827–842.

Boyd CD, Smith TJ, El-Kirat-Chatel S, Newell PD, Dufrêne YF, O'Toole GA. 2014. Structural Features of the *Pseudomonas fluorescens* Biofilm Adhesin LapA Required for LapG-Dependent Cleavage, Biofilm Formation, and Cell Surface Localization. *Journal of Bacteriology* 196: 2775–2788.

Carniello V, Peterson BW, van der Mei HC, Busscher HJ. 2018. Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth. *Advances in Colloid and Interface Science* 261: 1–14.

Chang W-S, Mortel M van de, Nielsen L, Guzman GN de, Li X, Halverson LJ. 2007. Alginate Production by *Pseudomonas putida* Creates a Hydrated Microenvironment and Contributes to Biofilm Architecture and Stress Tolerance under Water-Limiting Conditions. *Journal of Bacteriology* 189: 8290–8299.

Chaparro JM, Badri DV, Vivanco JM. 2014. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *The ISME Journal* 8: 790–803.

Chen M-Y, Chen M-J, Lee P-F, Cheng L-H, Huang L-J, Lai C-H, Huang K-H. 2010. Towards real-time observation of conditioning film and early biofilm formation under laminar flow conditions using a quartz crystal microbalance. *Biochemical Engineering Journal* 53: 121–130.

Cooley RB, O'Donnell JP, Sondermann H. 2016. Coincidence detection and bi-directional transmembrane signaling control a bacterial second messenger receptor. *eLife*, doi 10.7554/eLife.21848.

Costa-Gutierrez SB, Lami MJ, Santo MCC-D, Zenoff AM, Vincent PA, Molina-Henares MA, Espinosa-Urgel M, de Cristóbal RE. 2020. Plant growth promotion by *Pseudomonas putida* KT2440 under saline stress: role of *eptA*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104: 4577–4592.

Dalgaard P, Koutsoumanis K. 2001. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *Journal of Microbiological Methods* 43: 183–196.

Davey ME, O'toole GA. 2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 847–867.

Duque E, Torre J de la, Bernal P, Molina-Henares MA, Alaminos M, Espinosa-Urgel M, Roca A, Fernández M, Bentzmann S de, Ramos J-L. 2013. Identification of reciprocal adhesion genes in pathogenic and non-pathogenic *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology* 15: 36–48.

El-Kirat-Chatel S, Beaussart A, Boyd CD, O'Toole GA, Dufrêne YF. 2014. Single-Cell and Single-Molecule Analysis Deciphers the Localization, Adhesion, and Mechanics of the Biofilm Adhesin LapA. *ACS Chemical Biology* 9: 485–494.

Espinosa-Urgel M, Salido A, Ramos J-L. 2000. Genetic Analysis of Functions Involved in Adhesion of *Pseudomonas putida* to Seeds. *Journal of Bacteriology* 182: 2363–2369.

Fuqua C. 2010. Passing the baton between laps: adhesion and cohesion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Molecular Microbiology* 77: 533–536.

Gjermansen M, Nilsson M, Yang L, Tolker-Nielsen T. 2010. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: genetic elements and molecular mechanisms. *Molecular Microbiology* 75: 815–826.

Gjermansen M, Ragas P, Sternberg C, Molin S, Tolker-Nielsen T. 2005. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environmental Microbiology* 7: 894–904.

Govantes F. 2018. Serial Dilution-Based Growth Curves and Growth Curve Synchronization for High-Resolution Time Series of Bacterial Biofilm Growth. *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ)* 1734: 159–169.

Guo S, Vance TDR, Stevens CA, Voets I, Davies PL. 2019. RTX Adhesins are Key Bacterial Surface Megaproteins in the Formation of Biofilms. *Trends in Microbiology* 27: 453–467.

Hinsa SM, Espinosa-Urgel M, Ramos JL, O'Toole GA. 2003. Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Molecular microbiology* 49: 905–918.

Jakovleva J, Teppo A, Velts A, Saumaa S, Moor H, Kivisaar M, Teras R. 2012. Fis regulates the competitiveness of *Pseudomonas putida* on barley roots by inducing biofilm formation. *Microbiology* 158: 708–720.

Jenal U, Reinders A, Lori C. 2017. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nature Reviews Microbiology* 15: 271–284.

Jiménez-Fernández A, López-Sánchez A, Jiménez-Díaz L, Navarrete B, Calero P, Platero AI, Govantes F. 2016. Complex Interplay between FleQ, Cyclic Diguanylate and Multiple σ Factors Coordinately Regulates Flagellar Motility and Biofilm Development in *Pseudomonas putida*. *PLoS ONE* 11: 1–26.

Jucker BA, Harms H, Zehnder AJ. 1996. Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *Journal of Bacteriology* 178: 5472–5479.

Kaplan JB. 2010. Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *Journal of Dental Research* 89: 205–218.

Klausen M, Gjermansen M, Kreft J-U, Tolker-Nielsen T. 2006. Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. *FEMS Microbiology Letters* 261: 1–11.

Kohlstedt M, Starck S, Barton N, Stolzenberger J, Selzer M, Mehlmann K, Schneider R, Pleissner D, Rinkel J, Dickschat JS, Venus J, B.J.H. van Duuren J, Wittmann C. 2018. From lignin to nylon: Cascaded chemical and biochemical conversion using metabolically engineered *Pseudomonas putida*. *Metabolic Engineering* 47: 279–293.

Kwak M-J, Kong HG, Choi K, Kwon S-K, Song JY, Lee J, Lee PA, Choi SY, Seo M, Lee HJ, Jung EJ, Park H, Roy N, Kim H, Lee MM, Rubin EM, Lee S-W, Kim JF. 2018. Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato. *Nature Biotechnology* 36: 1100–1109.

La Rosa R, Behrends V, Williams HD, Bundy JG, Rojo F. 2016. Influence of the Crc regulator on the hierarchical use of carbon sources from a complete medium in *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology* 18: 807–818.

Lahesaaire A, Ainelo H, Teppo A, Kivisaar M, Heipieper HJ, Teras R. 2016. LapF and Its Regulation by Fis Affect the Cell Surface Hydrophobicity of *Pseudomonas putida*. *PLOS ONE* 11: e0166078.

Larsen T, Fiehn N-E. 2017. Dental biofilm infections – an update. *APMIS* 125: 376–384.

Loosdrecht MCM van, Norde W, Lyklema J, Zehnder AJB. 2004. Hydrophobic and electrostatic parameters in bacterial adhesion. *Aquatic Sciences*, doi 10.1007/BF00878244.

Lorite GS, Rodrigues CM, de Souza AA, Kranz C, Mizaikoff B, Cotta MA. 2011. The role of conditioning film formation and surface chemical changes on *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm evolution. *Journal of Colloid and Interface Science* 359: 289–295.

Martínez-García E, Nikel PI, Chavarría M, Lorenzo V de. 2014. The metabolic cost of flagellar motion in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* 16: 291–303.

Martínez-Gil M, Romero D, Kolter R, Espinosa-Urgel M. 2012. Calcium Causes Multimerization of the Large Adhesin LapF and Modulates Biofilm Formation by *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology* 194: 6782–6789.

Martínez-Gil M, Yousef-Coronado F, Espinosa-Urgel M. 2010. LapF, the second largest *Pseudomonas putida* protein, contributes to plant root colonization and determines biofilm architecture. *Molecular Microbiology* 77: 549–561.

Matilla MA, Pizarro-Tobias P, Roca A, Fernández M, Duque E, Molina L, Wu X, Lelie D van der, Gómez MJ, Segura A, Ramos J-L. 2011a. Complete Genome of the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas putida* BIRD-1. *Journal of Bacteriology* 193: 1290–1290.

Matilla MA, Ramos JL, Bakker PAHM, Doornbos R, Badri DV, Vivanco JM, Ramos-González MI. 2010. *Pseudomonas putida* KT2440 causes induced systemic resistance and changes in *Arabidopsis* root exudation. *Environmental Microbiology Reports* 2: 381–388.

Matilla MA, Travieso ML, Ramos JL, Ramos-González MI. 2011b. Cyclic diguanylate turnover mediated by the sole GGDEF/EAL response regulator in *Pseudomonas putida*: its role in the rhizosphere and an analysis of its target processes. *Environmental Microbiology* 13: 1745–1766.

Molina L, Ramos C, Duque E, Ronchel MC, García JM, Wyke L, Ramos JL. 2000. Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 315–321.

Molina L, Rosa RL, Nogales J, Rojo F. 2019. Influence of the Crc global regulator on substrate uptake rates and the distribution of metabolic fluxes in *Pseudomonas putida* KT2440 growing in a complete medium. *Environmental Microbiology* 21: 4446–4459.

Monds RD, O'Toole GA. 2009. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology* 17: 73–87.

Montag D, Frant M, Horn H, Liefelth K. 2012. Dependence of the initial adhesion of biofilm forming *Pseudomonas putida* mt2 on physico-chemical material properties. *Biofouling* 28: 315–327.

Moor H. 2013. *Pseudomonas putida* globaalse regulaatori Fis osalus biofilmi moodustumises. Magistritöö, Tartu Ülikool

Moor H, Teppo A, Lahesaare A, Kivisaar M, Teras R. 2014. Fis overexpression enhances *Pseudomonas putida* biofilm formation by regulating the ratio of LapA and LapF. *Microbiology* 160: 2681–2693.

Mortel M van de, Chang W-S, Halverson LJ. 2004. Differential tolerance of *Pseudomonas putida* biofilm and planktonic cells to desiccation. *Biofilms* 1: 361–368.

Navarro MVAS, Newell PD, Krasteva PV, Chatterjee D, Madden DR, O'Toole GA, Sondermann H. 2011. Structural Basis for c-di-GMP-Mediated Inside-Out Signaling Controlling Periplasmic Proteolysis. *PLOS Biology* 9: e1000588.

Nelson K. E., Weinel C., Paulsen I. T., Dodson R. J., Hilbert H., Martins dos Santos V. A. P., Fouts D. E., Gill S. R., Pop M., Holmes M., Brinkac L., Beanan M., DeBoy R. T., Daugherty S., Kolonay J., Madupu R., Nelson W., White O., Peterson J., Khouri H., Hance I., Lee P. Chris, Holtzapple E., Scanlan D., Tran K., Moazzez A., Utterback T., Rizzo M., Lee K., Kosack D., Moestl D., Wedler H., Lauber J., Stjepandic D., Hoheisel J., Straetz M., Heim S., Kiewitz C., Eisen J., Timmis K. N., Dusterhöft A., Tümmeler B., Fraser C. M. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* 4: 799–808.

Newell PD, Boyd CD, Sondermann H, O'Toole GA. 2011. A c-di-GMP Effector System Controls Cell Adhesion by Inside-Out Signaling and Surface Protein Cleavage. *PLOS Biology* 9: e1000587.

Nikel PI, de Lorenzo V. 2018. *Pseudomonas putida* as a functional chassis for industrial biocatalysis: From native biochemistry to trans-metabolism. *Metabolic Engineering* 50: 142–155.

Nilsson M, Chiang W-C, Fazli M, Gjermansen M, Givskov M, Tolker-Nielsen T. 2011. Influence of putative exopolysaccharide genes on *Pseudomonas putida* KT2440 biofilm stability. *Environmental Microbiology* 13: 1357–1369.

Oliveira R, Azeredo J, Teixeira P, Fonseca AP. 2001. The role of hydrophobicity in bacterial adhesion.

Oliver C, Hernández I, Caminal M, Lara JM, Fernández C. 2019. *Pseudomonas putida* strain B2017 produced as technical grade active ingredient controls fungal and bacterial crop diseases. *Biocontrol Science and Technology* 29: 1053–1068.

Osiro D, Colnago LA, Otoboni AMMB, Lemos EGM, de Souza AA, Filho HDC, Machado MA. 2004. A kinetic model for *Xylella fastidiosa* adhesion, biofilm formation, and virulence. *FEMS Microbiology Letters* 236: 313–318.

O'Toole G, Kaplan H b., Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. doi 10.1146/annurev.micro.54.1.49.

Puhm M. 2018. Söötmeekomponentide mõju *Pseudomonas putida* biofilmile. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool

Reichhardt C, Jacobs HM, Matwichuk M, Wong C, Wozniak DJ, Parsek MR. 2020. The versatile *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix protein CdrA promotes aggregation through different extracellular EPS interactions. *Journal of Bacteriology*, doi 10.1128/JB.00216-20.

Römling U, Galperin MY, Gomelsky M. 2013. Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77: 1–52.

Santos VAPMD, Heim S, Moore ERB, Strätz M, Timmis KN. 2004. Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* 6: 1264–1286.

Satchell KJF. 2011. Structure and Function of MARTX Toxins and Other Large Repetitive RTX Proteins. *Annual Review of Microbiology* 65: 71–90.

Sauer K, Camper AK. 2001. Characterization of Phenotypic Changes in *Pseudomonas putida* in Response to Surface-Associated Growth. *Journal of Bacteriology* 183: 6579–6589.

Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *Journal of Bacteriology* 184: 1140–1154.

Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari R. 2007. *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of Bacteriology* 189: 8746–8749.

Shah P, Swiatlo E. 2008. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Molecular Microbiology* 68: 4–16.

Smith TJ, Font ME, Kelly CM, Sondermann H, O'Toole GA. 2018. An N-Terminal Retention Module Anchors the Giant Adhesin LapA of *Pseudomonas fluorescens* at the Cell Surface: a Novel Subfamily of Type I Secretion Systems. *Journal of Bacteriology*, doi 10.1128/JB.00734-17.

Spaulding CN, Klein RD, Schreiber HL, Janetka JW, Hultgren SJ. 2018. Precision antimicrobial therapeutics: the path of least resistance? *npj Biofilms and Microbiomes* 4: 1–7.

Steinberger RE, Holden PA. 2005. Extracellular DNA in Single- and Multiple-Species Unsaturated Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5404–5410.

Svenningsen NB, Martínez-García E, Nicolaisen MH, de Lorenzo V, Nybroe O. 2018. The biofilm matrix polysaccharides cellulose and alginate both protect *Pseudomonas putida* mt-2 against reactive oxygen species generated under matrix stress and copper exposure. *Microbiology*, 164: 883–888.

Zimbro MJ (toim). 2009. Difco & BBL Manual: manual of microbiological culture media, 2. ed. Becton, Dickinson, Sparks, MD.

Timmis KN. 2002. *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environmental Microbiology* 4: 779–781.

Totsika M, Kostakioti M, Hannan TJ, Upton M, Beatson SA, Janetka JW, Hultgren SJ, Schembri MA. 2013. A FimH inhibitor prevents acute bladder infection and treats chronic cystitis caused by multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* ST131. *The Journal of Infectious Diseases* 208: 921–928.

Udaondo Z, Molina L, Segura A, Duque E, Ramos JL. 2016. Analysis of the core genome and pangenome of *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology* 18: 3268–3283.

Wackett LP. 2003. *Pseudomonas putida* —a versatile biocatalyst. *Nature Biotechnology* 21: 136–138.

Wang H, Sodagari M, Chen Y, He X, Newby BZ, Ju L-K. 2011. Initial bacterial attachment in slow flowing systems: Effects of cell and substrate surface properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 87: 415–422.

Wiens JR, Vasil AI, Schurr MJ, Vasil ML. 2014. Iron-Regulated Expression of Alginate Production, Mucoid Phenotype, and Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, doi 10.1128/mBio.01010-13.

Österberg S, Skärfstad E, Shingler V. 2010. The σ -factor FliA, ppGpp and DksA coordinate transcriptional control of the *aer2* gene of *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology* 12: 1439–1451.

Xiao Y, Nie H, Liu H, Luo X, Chen W, Huang Q. 2016. C-di-GMP regulates the expression of *lapA* and *bcs* operons via FleQ in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology Reports* 8: 659–666.

Xu L-C, Logan BE. 2005. Interaction Forces between Colloids and Protein-Coated Surfaces Measured Using an Atomic Force Microscope. *Environmental Science & Technology* 39: 3592–3600.

Yousef-Coronado F, Soriano MI, Yang L, Molin S, Espinosa-Urgel M. 2011. Selection of hyperadherent mutants in *Pseudomonas putida* biofilms. *Microbiology* 157: 2257–2265.

Yousef-Coronado F, Travieso ML, Espinosa-Urgel M. 2008. Different, overlapping mechanisms for colonization of abiotic and plant surfaces by *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiology Letters* 288: 118–124.

Yuste L, Hervás AB, Canosa I, Tobes R, Jiménez JI, Nogales J, Pérez-Pérez MM, Santero E, Díaz E, Ramos J-L, Lorenzo VD, Rojo F. 2006. Growth phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* KT2440 transcriptional machinery analysed with a genome-wide DNA microarray. *Environmental Microbiology* 8: 165–177.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Marge Puhm

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

“ Ekstratsellulaarsete peptiidide mõju *Pseudomonas putida* biofilmile *fis*-i üleekspressiooni tingimustes“, mille juhendaja on Riho Teras

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Marge Puhm

10.08.2020